

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK**

Nikolina Ričko

**UTJECAJ CINKA NA KADMIJEM UZROKOVANE PROMJENE U
RASTU I AKTIVNOSTI ANTIOKSIDACIJSKIH ENZIMA
U VODENOJ LEZIJI**

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2009.

Diplomski rad izradila sam u Laboratoriju za fiziologiju bilja u Botani kom zavodu Prirodoslovno – matemati kog fakulteta Sveu ilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Željke Vidakovi – Cifrek kojoj se ujedno zahvaljujem na savjetima, razumijevanju i velikoj pomo i tijekom izrade ovog rada.

Posebno se zahvaljujem doc. dr. sc. Mirti Tkalec na velikoj pomo i tijekom izvo enja eksperimentalnog dijela rada, i korisnim savjetima pri obradi podataka. Tako er zahvaljujem se na pomo i Vesni Majstorovi , samostalnoj tehni arki.

Najve a hvala mojim roditeljima koji su bili uz mene sve godine mog školovanja, što su mi omogu ili sve što mi je trebalo i bili podrška u svim trenucima mog studiranja. Zahvaljujem se ujedno kolegici Marini Horvati ek na vrlo vrijednim savjetima. Zatim mojim kolegicama, Martini, Jeleni H., Marijani, Ivani i Damiru N. na prijateljstvu, lijepim trenucima, potpori i razumijevanju tijekom studija, te na vrlo vrijednim prijedlozima i sugestijama.

Nikolina

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

UTJECAJ CINKA NA KADMIJEM UZROKOVANE PROMJENE U RASTU I AKTIVNOSTI ANTIOKSIDACIJSKIH ENZIMA U VODENOJ LEŠI

Nikolina Ričko

Botanički zavod Biološkog odsjeka
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu
Rooseveltov trg 6, Zagreb

SAŽETAK

Povišena količina teških metala (Cd i Zn) nepovoljno utječe na rast i razvoj vodenih biljaka. Kadmij (Cd) je neesencijalni i toksični element, dok je cink (Zn) esencijalni element potreban za aktivnost nekih enzima i ima važnu ulogu u stabilizaciji proteina i membrana. Cilj pokusa bio je istražiti djelovanje Cd i Zn na vodenu lešu, *Lemna minor* L., široko rasprostranjenu jednosupnicu koja se često koristi kao testni organizam. U hranjivu podlogu za uzgoj vodene leše dodan je kadmij (10 µM), cink (100 µM i 200 µM) te kombinacija kadmija i cinka (Cd 10 µM + Zn 100 µM te Cd 10 µM + Zn 200 µM). U istraživanju je proučen rast biljke i aktivnost antioksidacijskih enzima katalaze (CAT), askorbat-peroksidaze (APOX) i pirogalol-peroksidaze (POX). Utvrđeno je značajna inhibicija rasta biljaka tretiranih kadmijem i pojava kloroze listova već šestog dana pokusa. Enzimi katalaza i peroksidaza su pokazivali različite stupnjeve aktivnosti pod utjecajem tretmana istraživanim metalima. Biljke tretirane kadmijem imale su izrazito povišenu aktivnost CAT već trećeg dana pokusa, dok u uzorcima tretiranim i kadmijem i cinkom to povišenje aktivnosti nije bilo toliko izraženo. Aktivnost APOX je bila povišena u određenim tretmanima tek šestog dana pokusa, a aktivnost POX nije se značajno mijenjala. Iz spomenutih rezultata može se zaključiti da kadmij uzrokuje oksidacijski stres u biljci što dovodi do aktivacije antioksidacijskih enzima, prvenstveno katalaze. Cink, te kombinacija kadmija i cinka također uzrokuje oksidacijski stres i induciraju aktivnost antioksidacijskih enzima, ali u manjoj mjeri od kadmija. U tretmanima u kojima su bili prisutni kadmij i cink, primijećeno je da je cink ublažio učinak kadmija.

(47 stranice, 6 slika, 2 tablice, 113 literaturnih navoda, izvornik na hrvatskom jeziku)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici, Rooseveltov trg 6, Zagreb

Ključne riječi: teški metali / kadmij / cink / katalaza (CAT) / askorbat-peroksidaza (APOX) / pirogalol-peroksidaza (POX) / oksidacijski stres / *Lemna minor* L.

Mentor: Doc. dr. sc. Željka Vidaković -Cifrek

Ocjenjivači: Doc. dr. sc. Željka Vidaković -Cifrek

Doc. dr. sc. Zdravko Dolenec

Doc. dr. sc. Dubravka Hranilović

Rad prihvaćen: 01. 07. 2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

EFFECTS OF ZINC ON CADMIUM INDUCED CHANGES IN GROWTH AND ACTIVITY OF ANTIOXIDATIVE ENZYMES IN DUCKWEED

Nikolina Ri ko

Department of Botany, Division of Biology
Faculty of Science
University of Zagreb
Rooseveltov trg 6, Zagreb

ABSTRACT

Increased amounts of heavy metals (Cd and Zn) adversely influenced the growth and productivity of water plants. Cadmium (Cd) is a non-essential and toxic element, whereas zinc (Zn) is an essential element required for activity of many enzymes, and plays a significant structural role as stabilizer of proteins and membranes. The objective of this study was to estimate the interactive effects of Cd and Zn in duckweed, *Lemna minor* L. - widely spread monocot often used as a model organism. Cadmium, (10 μ M) and zinc (100 μ M and 200 μ M) and also their combination (10 μ M Cd + Zn 100 μ M and 10 μ M Cd + Zn 200 μ M) were added in the nutrient medium for cultivation of duckweed. The plant growth as well as antioxidative enzymes catalase (CAT), ascorbat-peroxidase (APX) and pirogalol-peroxidase (POX) activities were measured. The significant growth reduction and chlorosis were observed in the plants treated with 10 μ M Cd already at the sixth day of the experiment. Under the influence of investigated metals the enzymes catalase and peroxidases have shown different levels of activity. The third day of the experiment plants treated with cadmium had very high activity of CAT, while in the samples treated with both metals, Cd and Zn, the increase was not so obvious. While APOX activity was increased in the certain treatments at the sixth day of the experiment, POX activity was not significantly changed. Presented results shown that cadmium causes oxidative stress in plant which leads to activation of antioxidative enzymes, primarily catalase. Zinc, and combinations of zinc and cadmium also cause oxidative stress and induce activity of antioxidative enzymes, but to a lesser extent than cadmium. Cink added into nutrient medium containing cadmium, can to a certain extent alleviate toxic effect of kadmium.

(47 pages, 6 figures, 2 table, 113 references, original in Croatian)

This is deposited in: Central Biological Library, Rooseveltov trg 6, Zagreb

Key words: Heavy metals / Cadmium / Zinc / Catalase (CAT) / Askorbate-peroxidase (APOX) / pirogalol-peroxidase (POX) / oxidative stress / *Lemna minor* L.

Supervisor: Dr. Željka Vidakovi -Cifrek, assistant professor

Reviwers: Dr. Željka Vidakovi -Cifrek, assistant professor

Dr. Zdravko Dolenec, associate professor

Dr. Dubravka Hranilovi , assistant professor

Thesis accepted: 01. 07. 2009.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. TEŠKI METALI	2
1.1.1. Op a svojstva kadmija	2
1.1.2. Op a svojstva cinka.....	4
1.1.3. Djelovanje metala kadmija i cinka na biljke	6
1.2. OP A SVOJSTVA VODENE LE E	7
1.2.1. Lemna test	8
1.3. OKSIDACIJSKI STRES	9
1.3.1. Nastajanje reaktivnih oblika kisika (ROS) u stresnim uvjetima	10
1.4. MEHANIZMI ZAŠTITE BILJAKA OD OKSIDACIJSKOG STRESA	11
1.5. ANTIOKSIDACIJSKI ENZIMI	11
1.5.1. Katalaza.....	11
1.2.1. Peroksidaza	12
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	14
3. MATERIJAL I METODE.....	15
3.1. UZGOJ VODENE LE E (<i>Lemna minor</i> L.) U UVJETIMA <i>in vitro</i>	15
3.1.1. Priprema hranidbene podloge	15
3.1.2. Održavanje vodene le e u kulturi <i>in vitro</i>	16
3.2. IZVO ENJE POKUSA.....	16
3.2.1. Istraživane otopine	16
3.2.2. Postavljanje pokusa.....	17
3.2.3. Odre ivanje prirasta broja biljaka	17

3.2.4. Određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima.....	18
3.2.4.1. Priprema ekstrakata biljnog tkiva	18
3.2.4.2. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)	18
3.2.4.3. Određivanje aktivnosti askorbat-peroksidaze (APOX).....	19
3.2.4.4. Određivanje aktivnosti pirogallol-peroksidaze (POX).....	19
3.3. OBRADA REZULTATA	20
4. REZULTATI	21
4.1. MAKROSKOPSKI IZGLED VODENE LEŠE NA HRANJIVOJ PODLOZI S DODATKOM KADMIJA I CINKA	21
4.2. REALTIVAN PRIRAST BROJA BILJAKA	23
4.3. AKTIVNOST ANTIOKSIDACIJSKIH ENZIMA.....	24
4.3.1. Aktivnost katalaze.....	24
4.3.2. Aktivnost askorbat-peroksidaze	26
4.3.3. Aktivnost pirogallol-peroksidaze	28
5. RASPRAVA	30
5.1. UČINAK KADMIJA I CINKA NA IZGLED I PRIRAST VODENE LEŠE.....	30
5.2. DJELOVANJE KADMIJA I CINKA NA AKTIVNOST ANTIOKSIDACIJSKIH ENZIMA	33
6. ZAKLJUČAK	38
7. LITERATURA	39

POPIS KRATICA

APOX – askorbat-peroksidaza

CAT – katalaza

DNMRT – statistička metoda „Duncan’s New Multiple Range Test“

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina

GPOX – gvajakol-peroksidaza

GPX – glutation-peroksidaza

NADPH – nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat

POX – pirogalol-peroksidaza

P-S podloga - modificirana hranidbena podloga po Pirsonu i Seidelu (1950)

PVP – polivinilpolipirrolidon

ROS - reaktivni oblici kisika

SOD – superoksid-dismutaza

1. UVOD

Vodeni i kopneni biljni organizmi su najvažniji članovi svih zdravih ekosistema. Prvenstveno su važni kao primarni proizvođači i organske tvari, a time i energije potrebne za gotovo sve ostale oblike života, a ujedno su i izvor kisika (Wang 1991). Oni su vrlo često izloženi različitim okolišnim imbenicima koji na njih mogu imati nepovoljne učinke. Svaki imbenik koji ima negativno djelovanje na organizam naziva se stresni imbenik (engl. stressor), a odgovor organizma na njegovo djelovanje naziva se stres. Biljke izložene stresnim imbenicima pokazuju vidljive promjene kao što su sporiji rast i manja produktivnost. Ovisno o vrsti biljke, one mogu biti djelomično otporne na stres ili imati mogućnost prilagodbe na nepovoljne uvjete osobito ako su im izložene postupno, što znači da se intenzitet stresnog imbenika postupno povećava kroz dulji vremenski period. Ako se kao rezultat izlaganja stresu otpornost povećava, možemo reći da se biljka aklimatizirala a ta je pojava različita od prilagodbe koja je određena genetski. Poznato je da izlaganje biljke jednom stresnom imbeniku može potaknuti toleranciju i povećanu otpornost na drugi stresni imbenik ili više njih što dokazuje da mehanizmi otpornosti na različite vrste stresnih učinaka imaju mnoge zajedničke značajke. Neki od mehanizama obrane biljaka od stresnih imbenika obuhvaćaju sintezu stresnih proteina i povećanu aktivnost antioksidacijskih enzima.

Stres se u biljaka najčešće procjenjuje mjerenjem rasta ili asimilacijskih procesa, ali sve češće i mjerenjem promjena aktivnosti enzima ili praćenjem pojave proteina čija je biosinteza potaknuta stresom. Porastom onečišćenja okoliša zbog različitih ljudskih djelatnosti (npr. onečišćenje tla i vode industrijskim kemikalijama, teškim metalima, naftom, pesticidima i dr.) dodatno se povećavaju stresni uvjeti kojima su biljke izložene (Taiz i Zeiger 1991).

Vodene biljke se često koriste kao testni organizmi u biotestovima jer su u prirodi izložene tvarima iz hranjive podloge cijelom svojom površinom (Küpper i sur. 1996) za razliku od biljaka zakorijenjenih u tlu. Neke vodene biljke su vrlo osjetljive čak i pri maloj koncentraciji štetne tvari u vodi reagiraju promjenom stope rasta. To je vrlo značajno jer skraćuje vrijeme trajanja pokusa. Isto tako, neke se vodene biljke koriste za uklanjanje otopljenih soli, teških metala i toksinih organskih tvari iz drenažnih voda rudnika te iz vode u koju su npr. mineralna gnojiva i pesticidi, dospjeli ispiranjem obrađivog zemljišta, te iz gradova (Lewis 1995).

1.1. TEŠKI METALI

Pojam *teški metali* obuhvaća metale čija je gustoća veća od $5,0 \text{ g/cm}^3$. U tu grupu ubrajaju se kadmij (Cd), krom (Cr), živa (Hg), olovo (Pb), srebro (Ag) i dr. (Sanita di Toppi i Gabbrielli 1999). Neki teški metali (npr. cink i željezo) su esencijalni metali za biljke pa njihov manjak dovodi do poremećaja metabolizma i pojave vidljivih simptoma nedostatka.

Teški metali su u industrijskim područjima prisutni kao zagađivači i mogu dospjeti u vode i tlo. Tipični vidljivi simptomi trovanja biljaka teškim metalima su često slični ili čak isti simptomima nedostatka nekih esencijalnih hranjivih tvari (Siedlecka 1995). U tlu se često pojavljuju kao netopivi minerali, a oslobađanje teških metala iz tih minerala u otopljenom, biološki dostupnom obliku javlja se kao posljedica ljudskog djelovanja (npr. zakiseljavanja tla) i može izazvati velike štete u ekosistemima. Kemijski oblik teških metala u tlu velikim dijelom ovisi o prirodi samog metala, pH vrijednosti tla i prisutnosti drugih iona u tlu (Tyler i sur. 1989, Das i sur. 1997). Pretpostavlja se da teški metali djeluju na enzime preko grupa osjetljivih na metale, npr. SH-grupa ili histidina što dovodi do inaktivacije enzima (Van Assche i Clijsters 1990).

Budući da se metali kada su u tlu i vodi prisutni kao one iste i uglavnom pojavljuju u smjesi, odlučio sam istražiti kakvo je djelovanje kadmija i cinka na biljku prilikom istovremene primjene.

1.1.1. Opća svojstva kadmija

Kadmij pripada II b grupi periodnog sustava elemenata. Gustoća mu iznosi $8,6 \text{ g/cm}^3$ što je ujedno i razlog da se naziva teškim metalom. Kadmij je relativno rijedak element i u prirodi ne dolazi u elementarnom stanju već je povezan sa sulfidnim rudama ili cinkom, olovom i bakrom (IPCS 1992a). Neke kadmijeve soli, kao npr. sulfidi, karbonati i oksidi, su netopive u vodi dok su sulfati, nitrati i halidi topivi (IPCS 1992b). Kadmij je dvovalentan, neesencijalan i visoko toksičan teški metal.

Kadmij često nazivaju i metalom 20. stoljeća zbog njegove široke primjene (Wilson 1988, IPCS 1992a). Koristi se u galvanizaciji željeza, kao stabilizator za PVC, kao pigment u plastici i staklu te do nedavno u proizvodnji Ni-Cd baterija (IPCS 1992a).

Potje e od razli itih poljoprivrednih, rudarskih i industrijskih djelatnosti, ali tako er i od ispušnih automobilskih plinova (Foy i sur. 1978). U tlo kadmij može do i aplikacijom gradskog sme a, komposta i mulja, tako er i gnojdbom fosforim gnojivima proizvedenih iz sedimentnih fosforita s previše kadmija (Aravind i Prasad 2005). Time zapo inje kruženje kadmija kroz hranidbene lance. Pretpostavlja se da kadmij ulazi pasivno u korijen kroz tkivo kore korijena, a zatim apoplastno i/ili simplastno putuje u ksilem (Salt i sur. 1995a) u kompleksu s ligandima kao što su organske kiseline i/ili fitohelatini. Koliko e biljka primiti kadmija ovisi prvenstveno o njegovoj koncentraciji u vodi ili tlu, ali i o dostupnosti, o pH vrijednosti medija, redoks-potencijalu, temperaturi, koncentraciji ostalih hranjivih tvari u mediju te o vrsti biljke (Sanitá di Toppi i Gabbrielli 1999). Dalje u tom ciklusu životinje se hrane tim biljkama, a ovjek životinjama ili direktno biljkama. Na taj na in se ciklus završava ovjekom koji je i uzrok pove anju koli ine kadmija u ekosistemima. Zbog prijenosa kadmija kroz hranidbeni lanac prisutna je ve a zabrinutost nego kod drugih potencijalno toksi nih elemenata. Razlog tome su tri imbenika: visoka toksi nost, dugo vrijeme zadržavanja u ljudskom tijelu i visok stupanj mobilnosti u okolišu (Gil i sur. 1995).

U tlu i sedimentima je prisutan u koncentracijama koje su obi no više od 1 mg/kg (Peterson i Alloway 1979, Das i sur. 1997). Rije na voda sadrži otopljeni kadmij u koncentracijama izme u <1 i 13,5 ng/l. U nezaga enim podru jima u zraku je obi no manje od 1 ng/m³, a u tlu je srednja koncentracija izme u 0,2 i 0,4 mg/kg. U zaga enom tlu su prisutne mnogo ve e vrijednosti, do 160 mg/kg tla (IPCS 1992b). Poljoprivredno tlo se smatra one iš enim kada sadrži ve u koli inu one iš uju ih tvari od koli ina navedenih u Tablici 1 (izraženo u mg/kg⁻¹ suhog tla):

Tablica 1. Sadržaj pojedinih metala u razli itim tipovima tala

mg kg ⁻¹	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
Pjeskovito tlo	0,0-0,5	0-40	0-60	0,0-0,5	0-30	0-50	0-60
Praškasto – ilovasto tlo	0,5-1,0	40-80	60-90	0,5-1,0	30-50	50-100	60-150
Glinasto tlo	1,0-2,0	80-120	90-120	1,0-1,5	50-75	100-150	150-200

Tlo veže teške metale sljedećim rastom i nizom: kadmij, cink, olovo, bakar, te stoga kadmij lakše ulazi u tkiva nego olovo (IPCS 1992a). Taj podatak se odnosi na normalne uvjete (vlage, pH vrijednosti, saliniteta) koji vladaju u nezagaćenom tlu. U tlima s visokim sadržajem humusa i u glinastim tlima prisutna je veća koncentracija teških metala nego u pjeskovitim tlima koja su siromašna humusom (Niesink i sur. 1996).

U uvjetima normalne pH vrijednosti tla biljke primaju malu količinu teških metala kao što je kadmij (Das i sur. 1997). Pri sniženoj pH vrijednosti tla biljke imaju veću mogućnost uzimanja kadmija iz tla jer je on tada prisutan u slobodnom, otopljenom obliku. Najjače primanje kadmija je kod pH vrijednosti oko 6,0 (Street i sur. 1977, cit. Das i sur. 1997). Osim o pH vrijednosti, količina slobodnog kadmija u tlu ovisi i o količini organske tvari, gline i hidroksida u tlu koji vežu teške metale (Ellis i Knezek 1972, cit. Das i sur. 1997).

Glavni način smanjenja toksičnosti u inak teških metala na biljke je razvijanje tolerancije. Biljke tolerantne na kadmij svoju toleranciju ostvaruju na dva načina: imaju sposobnost sprečavanja apsorpcije kadmija ili sposobnost detoksikacije nakon njegove apsorpcije (Tyler i sur. 1989, Das i sur. 1997). Mogući mehanizmi detoksikacije metala u biljkama uključuju sljedeće: vezivanje metala za staničnu stijenu, smanjeni prijenos kroz stanične membrane, aktivno izbacivanje, odlaganje u staničnu vakuolu (kompartimentalizacija) i vezanje s fitohelatinima (Kneer i Zenk 1992).

1.1.2. Opća svojstva cinka

Cink pripada skupini teških metala kao i kadmij i zajedno s njim nalazi se u II b grupi periodnog sustava elemenata. On je za biljke esencijalni element i stoga treba biti prisutan u organizmu u određenoj količini. Dakle, cink je koristan element jer u određenoj količini inama djeluje kao biljna hranjiva tvar (Shier 1994 i Welch 1995), ali u visokoj koncentraciji je toksičan. U prirodi dolazi u obliku cinkovog oksida (ZnO). U vodenoj otopini tla cink je prisutan u obliku hidratiziranog Zn^{2+} iona te u kompleksu s organskim ligandima (McBride 1989).

Podrijetlo cinka u tlu je iz primarnih i sekundarnih minerala. Kisele stijene sadrže manje cinka (granit, gnajsi), a alkalne znatno više (bazalt). Prosječan sadržaj cinka u tlu je 5-20 ppm. Raspoloživost cinka za biljke je veća u kiselim tlima i u tim okolnostima postoji opasnost od njegovog ispiranja iz tla. Nedostatak cinka se javlja najčešće na teškim, glinovitim tlima iz tog

razloga što se cink vrlo vrsto veže na esticu gline koja djeluje kao ionski izmjenjiva te mu je koncentracija u vodenoj fazi tla izuzetno niska.

Biljke primaju cink kao kation Zn^{2+} , ZnCl^+ , $[\text{Zn}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$, $\text{Zn}(\text{OH})^+$ i Zn-kelate i za razliku od željeza, mangana, bakra i molibdena u biljkama je uvijek u obliku dvovalentnog iona Zn^{2+} . Primanje cinka je aktivan proces (sekundarni aktivni prijenos) pri čemu inhibitorno djeluju slijedeći ioni: $\text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} = \text{Sr}^{2+} = \text{Ba}^{2+}$. Sadržaj cinka u biljkama je nizak i ovisno od biljne vrste koncentracija je u granicama od 0.6 ppm (jabuka) do 83 ppm (konoplja). Kod niske temperature ili višeg sadržaja fosfora u tlu primanje cinka je smanjeno. Ta pojava posebice je značajna za kukuruz kod kojeg fosfor često inducira deficit cinka uz akumulaciju većih količina željeza. Pokretljivost cinka u biljci je osrednja (bolja od željeza, bora i molibdena), a smatra se da je u ksilemu prisutan u obliku citrata, kelata ili kao slobodan ion.

Fiziološka uloga cinka je vrlo opsežna i značajna, posebice u metabolizmu proteina. Sastavni je dio mnogih enzima gdje kao dvovalentni kation gradi kelate, odnosno povezuje enzim sa supstratom. Lorimer (1981) i Lorimer i Miziorko (1981) su objavili istraživanje o sudjelovanju cinka u građi enzima karboanhidraze koja provodi reakciju $\text{OH}^- + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{HCO}_3^-$, dehidrogenaza (npr. malat-dehidrogenaze, glutamat-dehidrogenaze itd.), alkohol-dehidrogenaze, superoksid-dismutaze itd. (Hewitt 1983), a ujedno je i njihov aktivator (enzima sa SH grupom, aldolaza, izomeraza, DNA-aza itd.). Značaj cinka je izuzetno velik u biosintezi DNA i RNA (*RNA polimeraza*), sintezi proteina (preko sinteze RNA i utjecaja na strukturu ribosoma), u fotosintezi (Van Assche i Clijsters 1984), sintezi auksina (Shier 1994). Cink utječe na rast biljaka preko utjecaja na biosintezu triptofana, ima ulogu u stabilizaciji biomembrana te pomaže u svojim antioksidacijskim svojstvima pobuđuje aktivnost antioksidacijskih enzima (Aravind i sur. 2003). Cink također utječe na aktivnost ribuloza-1,5-difosfat-karboksilaze-oksigenaze, primanje i transport fosfora i aktivnost fosfataza, te u biljkama povećava otpornost prema bolestima (preko utjecaja na sintezu proteina), manjku vode (smanjuje transpiraciju) i niskim temperaturama.

1.1.3. Djelovanje metala kadmija i cinka na biljke

Kadmij je toksičan kako za ljude, tako i za biljne i životinjske organizme. Rije ni organizmi su osjetljiviji na niže koncentracije kadmija nego morski organizmi (IPCS 1992b).

U slučaju kratkotrajnog izlaganja kadmij uzrokuje samo blage simptome, ali dugotrajno izlaganje može imati i letalne posljedice. To znači da se simptomi pojavljuju vrlo kasno nakon početka izlaganja što je slučaj i kod brojnih drugih teških metala.

Najčešći simptom trovanja kadmijem je usporen i smanjen rast i kloroza zelenih organa koja je najizraženija u području izmeću lisnih žila. Ostali simptomi su pojava sitnijeg lišća i rasta u obliku rozete (skrtačenje internodija) u mlađem lišću, razvoj tanjih stabljika, manji prirast listića, te djelomično izbjeljivanje zelenih tkiva. Kloroza se može pojaviti kao posljedica nedostatka željeza ili kao posljedica interakcije kadmija i željeza (Das i sur. 1997). Naime, dokazano je da prevelika količina kadmija u hranjivoj podlozi ili tlu smanjuje sposobnost primanja željeza u biljku (Haghiri 1973, cit. Das i sur. 1997), direktno ili indirektno inhibira fiziološke procese kao što su disanje, fotosinteza, prijenos vode i izmjena plinova (Van Assche i Clijsters 1990). Istraživanja na višim biljkama uzgajanim na tlu kontaminiranom kadmijem pokazuju redukciju stope transpiracije i količine vode u biljci (Bazzaz i sur. 1974, Costa i sur. 1994).

Glavni i inače toksični aspekt cinka je inhibicija rasta (Collins 1981). Toksičnost cinka ovisi o pH vrijednosti o kojoj ovisi koncentracija raspoloživog cinka u otopini tla. Visoka koncentracija cinka može izazvati toksičnost u biljkama (Daviscarter i Shuman 1993) koja se u prirodi rijetko javlja i to samo na kiselim tlima i rudištima. Kritična granica suviška cinka je 200-500 ppm u stanicama lišća, a ovisi se niskim rastom, sitnim listovima i smanjenim korijenom (Baker 1978, Bradshaw i McNeilly 1981), lišće sadrži crvenkasto-smeđe pjege, ali za razliku od suviška željeza i mangana, one se podjednako javljaju na mlađem i starijem lišću. Van Assche (1973) je objavio da visoka koncentracija cinka inhibira metaboličku aktivnost. Smatra se da je umjereno toksičan na biljke roda *Lemna* (Wang 1986) i indirektno inducira oksidacijski stres.

1.2. OPĆA SVOJSTVA VODENE LEŠE

Vodne lešice pripadaju porodici *Lemnaceae*. Vrlo su male i jednostavne vodene biljke cvjetnice koje rastu slobodno plivaju i na površini vode i nisu nikada pričvršćene za podlogu (Huebert i Shay 1993). Široko su rasprostranjene od tropskog do umjerenog klimatskog područja (Hillman 1961) i služe kao hrana pticama i malim životinjama te osiguravaju hranu, sklonište i sjenu vodenim organizmima (Wang 1991). Filogenetski, one su jednosupnice. Porodica broji oko 40 kozmopolitski rasprostranjenih vrsta (Hillman i Culley 1978), a unutar porodice razlikujemo četiri roda: *Lemna*, *Spirodela*, *Wolffiella* i *Wolffia* (Boniardi i sur. 1994).



Slika 1. Vodena lešica *Lemna minor* L. u prirodnom okruženju (snimio Michal Mašas)

Biljke iz porodice *Lemnaceae* imaju tri važne karakteristike. Prva je poseban način vegetativnog rasta. Svaki listić ima dvije meristemske regije koje stvaraju nove listiće. Svaki listić može stvoriti 10–20 novih biljaka nakon čega tkivo matične biljke propada. Kao drugu karakteristiku treba istaknuti da listići ne ostaju trajno povezani s matičnom biljkom, već se odvajaju. Stoga kolonije vodene lešice imaju svega nekoliko biljaka. I treća, ne manje važna karakteristika je značajna progresivna redukcija svih struktura koje nisu nužne za život na

površini ili neposredno ispod površine staja ih voda te gotovo potpuno odsustvo drvenastog tkiva (Hillman i Culley 1978).

Vodeni makrofiti su prvi organizmi koji su pod utjecajem one ispranog otpada otpuštenih u vodu. Većina ih je vrlo osjetljiva na veliki broj zagađujućih tvari pa se koriste kao testni organizmi za istraživanje i procjenu štetnih utjecaja na vodene ekosisteme (Wang 1991).

Vodene leće su osjetljive na teške metale (npr. nikal, kadmij, živu, bakar, olovo i dr.), herbicide (Wang 1991), te industrijske i komunalne otpadne tvari (Taraldsen i Norberg-King 1990). Ponekad su osjetljivije na različite tvari od drugih organizama pa se već i one koriste kao testni organizmi (Wang 1991). Osim toga, kod vodene leće vrste *Lemna minor* tretirane kadmijem i olovom dolazi do promjene aktivnosti nekih enzima (Mohan i Hosetti 1997) što se može koristiti kao rani pokazatelj toksičnosti u vodu (Van Assche i Clijsters 1990).

Poznato je da su sve vrste iz porodice *Lemnaceae* osjetljive i na male količine kadmija, pa tako već koncentracija od 50 µg/l uzrokuje smanjeni rast vrste *Lemna minor* (Wang 1986). S druge strane, neke vrste vodene leće mogu tolerirati i akumulirati određenu količinu kadmija (Dirilgen i Inel 1994). Na primjer, da količina kadmija u listu ima vrste *Spirodela polyrrhiza* raste s povećanjem koncentracije kadmija u otopini tj. ta vrsta djeluje kao bioakumulator pa se može koristiti kao „filter“, za pročišćavanje otpadnih voda (Sajwan i Ornes 1994).

1.2.1. Lemna test

Razlog odabira vodene leće za moje istraživanje je, osim osjetljivosti na prisutnost kadmija i cinka, njihova prikladnost za rad u laboratorijskim uvjetima. Lako se uzgajaju i održavaju u kulturi *in vitro*, malih su dimenzija i brzo se razmnožavaju. Osim toga, jednostavne su građe i imaju vegetativni način razmnožavanja kojim nastaju genetički identične biljke (klonovi). K tome valja pridodati da primaju toksikante iz medija ne samo korijenom, već cijelom donjom površinom listova. Također, prednost testova koji se izvode na biljkama koje rastu u kulturi su sterilni i dobro definirani uvjeti kultivacije te neovisnost o godišnjem dobu, klimi i temperaturi. Tvari koje se u inak želi istražiti dodaju se u hranjivu podlogu i na temelju rasta i razvoja biljaka procjenjuje se u inak ili toksičnost istraživanih tvari (Lewis 1995, Wang 1986a i Wang 1990).

Najčešće mjereni parametri u Lemna-testu su prirast broja biljaka, gdje se u određenim vremenskim razmacima broji svaka vidljiva biljka (Wang 1991). Lemna-testom procjenjuje

se u inak testiranih tvari na temelju rasta i morfoloških promjena biljaka. Značajno je da se na vodenjoj lje i mogu određivati i neki drugi mjerljivi pokazatelji – npr. antioksidansi i antioksidacijski enzimi.

Testovi se mogu izvoditi na dva načina, kao statični ili kao prototični testovi. Statični su jednostavniji i ekonomičniji (Wang 1990). U svojem radu koristila sam se statičnim testom koji se izvodi tako da se biljke presade na hranjivu podlogu uz dodatak istraživane otopine i prati se odabrani pokazatelj tijekom njihovog eksponencijskog rasta. U novije vrijeme se kao pokazatelji stresa koriste i aktivnost i sastav izoenzima peroksidaze te sastav ukupnih proteina (Tkalec i sur. 2003).

1.3. OKSIDACIJSKI STRES

Kao posljedica prekomjerne produkcije reaktivnih oblika kisika (engl. reactive oxygen species - ROS) u stanicama se javlja oksidacijski stres. Općenito, svi stresni uvjeti u određenoj mjeri mogu dovesti do promjene količine ROS u stanici. U malim količinama reaktivni oblici kisika mogu imati značajnu ulogu u prijenosu signala, međutim prekomjerna količina ROS dovodi do oksidacijskih oštećenja makromolekula u stanici što najvjerojatnije može uzrokovati vrlo ozbiljna oštećenja i na koncu smrt same biljne stanice.

Kao najznačajniji reaktivni oblici kisika su: singletni kisik ($^1\text{O}_2$), vodikov peroksid (H_2O_2), superoksidni radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$) i hidroksilni radikal (OH^{\bullet}) (Kappus 1985). Proces nastanka radikala u stanicama u stresnim uvjetima je neprekidan i „slučajan“. ROS se u određenoj mjeri javljaju kao rezultat normalne metaboličke aktivnosti u stanici. U normalne aerobne metaboličke reakcije koje dovode do nastajanja ROS u stanicama ubrajaju se dišni lanac u mitohondrijima, lanac prijenosa elektrona u kloroplastima i fotorespiracija.

Štetni učinci reaktivnih oblika kisika su prije svega oštećenje molekule DNA, oksidacija lipida i oksidacija aminokiselina u proteinima.

1.3.1. Nastajanje reaktivnih oblika kisika (ROS) u stresnim uvjetima

Iako se ROS formiraju tijekom normalnog stanja i normalnog metabolizma, njihovo prekomjerno stvaranje isto je povezano sa stresnim uvjetima. Povećanu količinu ROS mogu uzrokovati sljedeći abiotički stresni uvjeti: izlaganje visokim svjetlosnim intenzitetima, suša i solni stres, izlaganje visokim i niskim temperaturama, teškim metalima, zagađenom zraku, herbicidima, mehaničkom i fizičkom stresu te napadu patogena.

Izlaganje visokim svjetlosnim intenzitetima jedan je od najčešćih izvora oksidacijskog stresa u biljaka. Proizvodnja ROS inducirana jakim svjetlom osobito je izražena kada je u kombinaciji s dodatnim stresnim čimbenicima koji uzrokuju ograničenu fiksaciju CO₂ (Dat i sur. 2000). Stoga inhibicija stope fotosinteze uzrokovana sušom vodi do povećanja proizvodnje ROS u kloroplastima. Izlaganje visokim i niskim temperaturama također uzrokuje akumulaciju ROS. Mehanizmi kojima se ROS nakupljaju u takvim uvjetima su različiti, ali primarno mjesto proizvodnje u biljkama su kloroplasti (Dat i sur. 2000).

Štete koje uzrokuju teški metali bakar (Cu), kadmij (Cd), cink (Zn) i željezo (Fe), te aluminij (Al), koji se ne ubraja u teške metale, povezane su s oksidacijskim stresom. Kad su ti metali prisutni u prevelikim količinama uzrokuju stvaranje ROS i lipidnu peroksidaciju (Dat i sur. 2000). Atmosferski zagađivači poput ozona (O₃) i sumporova dioksida (SO₂) smatraju se značajnim uzrokom propadanja šuma jer uzrokuju kisele kiše. Osim toga, ti plinovi ulaze kroz pučice u stanice listnog mezofila i pored ostalih u inake (npr. zakiseljavanje apoplasta), uzrokuju i oksidacijski stres u stanicama.

Postoji nekoliko herbicida koji proizvode ROS, ili direktnim djelovanjem na prijenos elektrona u tilakoidnoj membrani ili inhibicijom biosintetskog puta karotenoida – skupine pigmenta koji djeluju kao zaštita fotosintetskog aparata.

U odgovor na fizičko i mehaničko ozljeđivanje biljke uključeno je nekoliko mehanizama, a jedan od njih uključuje akumulaciju ROS (Dat i sur. 2000).

1.4. MEHANIZMI ZAŠTITE BILJAKA OD OKSIDACIJSKOG STRESA

Biljke su morale razviti u inkovitu zaštitu od djelovanja stresnih imbenika jer su one sesilni organizmi i ne mogu zamijeniti stanište kad nastupe nepovoljni uvjeti. Kao zaštita od povišene količine reaktivnih oblika kisika značajan je antioksidacijski sustav biljaka, a u to ubrajamo neenzimske antioksidanse i antioksidacijske enzime. Prije same pojave vidljivih simptoma nastupaju promjene enzimске aktivnosti.

Sanità di Toppi i Gabbrielli (1999) izložili su hipotezu o «općenitom adaptacijskom sindromu» prema kojoj različite vrste stresa u biljaka potiču različite ili identične mehanizme obrane kao što su promjena metabolizma glutationa i askorbinske kiseline, indukcija antioksidacijskih enzima i stresnih proteina, stvaranje etilena, prolina, kompartmentalizacija i lignifikacija. Svi su ti nespecifični odgovori zajednički za stresne imbenike poput prisutnosti teških metala, povišenog saliniteta, nepovoljne temperature, prisutnosti ozona i suše.

1.5. ANTIOKSIDACIJSKI ENZIMI

Ova metabolička promjena u stresnim uvjetima do koje dolazi i prije pojave vidljivih simptoma je povećanje aktivnosti antioksidacijskih enzima. Sve je više dokaza da različiti stresni uvjeti uzrokuju stvaranje povećane količine reaktivnih oblika kisika (vodikov peroksid, superoksidni radikal, singletni kisik, hidroksilni radikal) koji mogu reagirati s proteinima nukleinskim kiselinama i narušiti njihovu strukturu i funkciju.

Od reaktivnih oblika kisika biljke se mogu zaštititi indukcijom antioksidacijskih enzima kao što su nespecifične peroksidaze, superoksid dismutaza i katalaza te povećanom količinom antioksidacijskih tvari poput askorbinske kiseline, glutationa i karotenoida.

1.5.1. Katalaza

Katalaza (CAT) je tetramerni enzim koji sadrži hem. Uspješno katalizira dismutaciju vodikovog peroksida u vodu i kisik, štiti i tako stanicu od vodikovog peroksida kojeg razlaže na vodu i kisik. Katalaza je smještena u peroksisomima i glikoksisomima te ima veliku katalitičku aktivnost ali slabu supstratnu specifičnost jer treba istovremeno vezanje dviju

molekula vodikovog peroksida u aktivnom mjestu (Dat i sur. 2000). Djeluje kada je prisutna velika količina H_2O_2 .

Ekspresija gena za CAT nije samo razvojno regulirana već je osjetljiva na različite okolišne signale. Njihova aktivnost u stanici je stalna, a razina aktivnosti se može naglo smanjiti pod stresnim uvjetima koji često djeluju na razini translacije. Aktivnost katalaze može biti inhibirana niskim temperaturama i toplotnim stresom (Dat i sur. 2000).

1.5.2. Peroksidaza

Peroksidaze su enzimi prisutni u svim živim organizmima uključujući i gljive i prokariote. One su monomerni glikoproteini koji imaju ulogu u kataliziranju oksidacije pojedinih staničnih tvari (npr. fenolnih spojeva, askorbinske kiseline, glutaciona i dr.) koristeći vodikov peroksid ili organski hidroperoksid kao supstrat (Gaspar i sur. 1991).

Postoji veliki broj izoenzima peroksidaze koji obavljaju različite biokemijske funkcije ovisno o njihovom rasporedu u različitim staničnim odjeljcima i o supstratnoj specifičnosti (Pandolfini i Gabbrielli 1993). Bitno je naglasiti da u usporedbi s katalazom peroksidaze imaju puno veću afinitet za vodikov peroksid i nalaze se u svim staničnim odjeljcima.

Dvije su grupe peroksidaza s obzirom na fiziološku ulogu i supstratnu specifičnost (Asada 1992): u prvu grupu ubrajamo nespecifične peroksidaze koje koriste vodikov peroksid za različite oksidacijske reakcije. To je karakteristika slaba supstratna specifičnost. Uključene su u procese diferencijacije stanica, biosinteze lignina, suberina i etilena, razgradnju auksina, zarastanje rana te obranu od patogena zbog svojih baktericidnih i fungicidnih svojstava (Gaspar i sur. 1991). Ovdje se ubrajaju gvajakol- (GPOX) i pirogalol-peroksidaze (POX) gdje gvajakol, odnosno pirogalol mogu poslužiti kao donori elektrona u uvjetima *in vitro*. Drugoj skupini pripadaju peroksidaze čija je glavna uloga uklanjanje vodikovog peroksida i organskih hidroperoksida te lipidnih peroksida kako ne bi došlo do nastajanja jako reaktivnih radikala koji oksidiraju sve stanične komponente i uzrokuju stanična oštećenja. Ovdje se ubrajaju askorbat- (APOX) i glutation-peroksidaza (GPX). Da bi peroksidaze reducirale H_2O_2 u vodu potreban im je reducirajući supstrat, a to je kod biljaka najčešće askorbat (Asada 1992).

Različiti stresni uvjeti (suša, hipoksija, osmotski stres, povišena ili snižena temperatura, onečišćenje tla, vode ili zraka, teški metali, zračenje, infekcija patogenima, oksidacijski uvjeti) uzrokuju promjenu peroksidazne aktivnosti (Repka i Fischerová 1996, Ren i sur. 1999).

Peroksidaze se zato primjenjuju kao nespecifični pokazatelji stresa na biljku prije pojave vidljivih posljedica kao što su npr. opadanje lišća, kloroza i zaostajanje u rastu (Pandolfini i sur. 1992).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Problem one iš enja okoliša zbog ljudske aktivnosti postao je dio svakodnevice. Jedan od primjera su kisele kiše koje nepovoljno djeluju na same biljke, ali utječu i na tlo. One naime zakiseljavaju tlo i time povećavaju topljivost mineralnih tvari što dovodi do povećanja koncentracije slobodnih iona metala u tlu. S druge strane uvijek sve više svojim djelovanjem na prirodu, u potrazi za boljim i lakšim načinom života, one iš uje okoliš. Neki se one iš iva i otapaju u vodi pa se šire i u vodene ekosisteme. Njihovo toksično djelovanje ostvaruje se putem pitke vode, ali i putem biljaka koje ih uzimaju iz medija na kojem rastu te na taj način uključuju u hranidbeni lanac. Stoga su povišene koncentracije teških metala veliki ekološki problem ne samo za biljke kod kojih djeluju fitotoksično nego i za cijeli drugi živi svijet, životinje i ljude.

Cilj istraživanja bio je istražiti toksično djelovanje teških metala kadmija i cinka odnosno procijeniti u kojoj mjeri oni mogu štetno djelovati kada su u hranjivoj podlozi prisutni zasebno i u kombinaciji. Kadmij, metal koji se u okoliš otpušta prvenstveno rudarenjem i metalurgijskim procesima, jedna je od glavnih tvari odgovornih za one iš enje vode (da Costa i de Franca 1998). Suprotno od njega, cink je esencijalni element za rast i razvoj biljaka (Shier 1994 i Welch 1995), ali ako je prisutan u previsokoj koncentraciji može biti toksičan. U prvom dijelu rada sam istražila u inak kadmija i cinka – zasebno i u kombinaciji, na rast vodene leće.

Dosadašnja istraživanja djelovanja teških metala su dokazala da oni mogu uzrokovati oksidacijski stres u biljkama. Stoga sam u nastavku istraživanja mjerila i aktivnost antioksidacijskih enzima, katalaze (CAT), askorbat-peroksidaze (APOX) i pirogalol-peroksidaze (POX) u ekstraktima biljaka koje su rasle na podlogama s dodatkom kadmija (10 μM) i cinka (100 μM i 200 μM). Aktivnost tih enzima pratila sam tijekom dva tjedna izlaganja kadmiju i cinku.

Kao modelni organizam za svoje istraživanje izabrala sam vodenu leću (*Lemna minor* L.) prvenstveno zbog njezine visoke osjetljivosti na teške metale i lakog uzgoja u kontroliranim laboratorijskim uvjetima.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. UZGOJ VODENE LEŠE (Lemna minor L.) U UVJETIMA *in vitro*

Vodena leša se već niz godina uzgaja u klima-komori u uvjetima *in vitro*. Sakupljena je u Botaničkom vrtu Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Prilikom uvođenja u kulturu *in vitro* 1995. godine biljke su sterilizirane etanolom i živinim kloridom postupkom po Krajnc i Devidéu (1980).

3.1.1. Priprema hranidbene podloge

Biljke su uzgajane na modificiranoj Pirson–Seidelovoj (P-S) hranidbenoj podlozi (Pirson i Seidel 1950). Sastav prikazuje Tablica 2.

Tablica 2. Sastav modificirane P-S hranidbene podloge (Pirson i Seidel 1950)

Makroelementi	mg dm ⁻³	mmol dm ⁻³
KNO ₃	400	3,95
KH ₂ PO ₄	200	1,47
MgSO ₄ × 7H ₂ O	300	1,21
CaCl ₂ × 2H ₂ O	804	5,46
Mikroelementi	mg dm ⁻³	mmol dm ⁻³
MnCl ₂ × 4H ₂ O	0,3	0,0015
H ₃ BO ₃	0,5	0,0081
Na ₂ – EDTA × 2H ₂ O	18,6	0,049
željezni citrat	5,0	0,02
Organski dodaci	g dm ⁻³	mmol dm ⁻³
Saharoza	10,0	29,2
Asparagin	0,1	0,66

pH vrijednost hranidbene podloge podešavana je na 4,55 dodatkom otopine kalijevog hidroksida (KOH) koncentracije $0,1 \text{ mol/dm}^3$.

Za održavanje kulture rabljene su Erlenmeyerove tikvice volumena 300 mL napunjene sa 100-150 mL hranidbene podloge, za epljene vatom i aluminijskom folijom, te sterilizirane autoklaviranjem pri temperaturi od $124 \text{ }^\circ\text{C}$ i tlaku od 0,15 MPa u trajanju od 20 minuta. Nakon autoklaviranja tikvice ostavljene preko no i u sterilnoj komori da bi poprimile sobnu temperaturu.

3.1.2. Održavanje vodene leće u kulturi in vitro

Biljke su presađivane u laminaru (komori s horizontalnim strujanjem zraka za rad u sterilnim uvjetima). Neposredno prije inokulacije kolonija vodene leće sterilizirala sam metalni pribor uranjaju i ga u 70%-tnu alkoholnu otopinu i spaljuju i ga nad plamenikom. Pojedina ne zdrave kolonije s 2-3 biljke uzimala sam iz izvorišne kulture i nasađivala u Erlenmeyerove tikvice od 300 mL koje su sadržavale 150 mL tekuće hranidbene P-S podloge.

Nakon presađivanja biljke su prenesene u klima-komoru, gdje se vodena leća razmnožavala, isključivo vegetativno, i rasla u uvjetima dugog dana (16 sati osvjetljenja i 8 sati tame), na temperaturi $24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ uz umjetnu rasvjetu bijelih fluorescentnih svjetiljki ($90 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$).

3.2. IZVODENJE POKUSA

3.2.1. Istraživane otopine

Istraživala sam u inak ukupno pet otopina kadmija i cinka te njihove kombinacije. Svaki uzorak i kontrolu pripremila sam u 8 replika. Kontrola je bila hranidbena podloga napravljena po Pirsonu i Seidelu (Pirson i Seidel 1950). Prvi uzorak je u hranidbenoj podlozi sadržavao kadmijev klorid ukupne koncentracije kadmija $10 \mu\text{M}$, drugi uzorak je sadržavao cinkov sulfat u koncentraciji $100 \mu\text{M}$, treći uzorak sadržavao je također cinkov sulfat, ali u višoj koncentraciji - $200 \mu\text{M}$, četvrti uzorak bio je kombinacija kadmija i cinka ($10 \mu\text{M}$ kadmija i $100 \mu\text{M}$ cinka), a peti uzorak također kombinacija kadmija i cinka, ali cink je bio prisutan u višoj koncentraciji ($200 \mu\text{M}$).

3.2.2. Postavljanje pokusa

Istraživanje djelovanja kadmija i cinka te njihove kombinacije provedeno je tako da je svaki uzorak pripremljen u 8 replika. U svaku tikvicu (volumena 100 ml koja je sadržavala 60 ml sterilizirane hranjive podloge u koju je prije autoklaviranja dodana istraživana tvar – kadmij i/ili cink) inokulirana je jedna zdrava kolonija s 2-3 biljke. Nakon presađivanja biljke su prenesene u klima – komoru, gdje je tokom 15 dana praćen rast i razvoj vodene leće. Pratila sam i bilježila izgled biljke i broj biljaka.

Za mjerenje aktivnosti enzima (katalaze, askorbat-peroksidaze i pirogalol- peroksidaze) vodena leća je uzgajana na podlogama uz dodatak istraživane tvari u tikvicama volumena 300 ml. Mjerenja su provođena 3., 6. i 12. dana. Aktivnost enzima sam određivala spektrofotometrijskim mjerenjem.

3.2.3. Određivanje prirasta broja biljaka

Prirast broja biljaka određivan je brojanjem biljaka svaki drugi dan u trajanju od 15 dana. Prilikom postavljanja pokusa zabilježila sam početni broj biljaka u pojedinoj tikvici (prvi dan pokusa), a zatim sam pratila rast i razmnožavanje vodene leće 3., 5., 8., 10., 12. i 15.-ti dan pri čemu sam bilježila broj biljaka u svakoj tikvici iz svih šest uzoraka (ukupno 48 tikvica). Dobiveni podaci uvršteni su u formulu (Ensley i sur. 1994) za relativan prirast broja listića vodene leće koja glasi:

$$\text{Prirast broja biljaka} = \frac{\text{broj listića } n - \text{ti dan} - \text{broj listića 1. dan}}{\text{broj listića 1. dan}}$$

$$n = 3, 6, 8, 10, 13, 15$$

3.2.4. Određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima

3.2.4.1. Priprema ekstrakata biljnog tkiva

Za određivanje aktivnosti katalaze, te askorbat- i pirogalol-peroksidaze priredila sam ekstrakte na sljedeći način:

Po 150 mg liofiliziranog tkiva homogenirala sam u hladnom tarioniku u 1,5 ml ohlađenog 100 mM kalij-fosfatnog pufera pH = 7 koji je sadržavao 1 mM EDTA i 2 mM askorbata. Prije početka homogeniranja u tarionik sam dodala na vrh spatule malo netopivog polivinilpolipirrolidona (PVP). Homogenat sam centrifugirala pri temperaturi od 4 °C, 20 minuta pri 30 000 g. Dobiveni ekstrakt prelila sam u iste ependorf epruvete te koristila za spektrofotometrijsko mjerenje aktivnosti antioksidacijskih enzima. Koristila sam UV/VIS spektrofotometar Specord, Analytik Jena, Njemačka.

3.2.4.2. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Za mjerenje aktivnosti CAT koristila sam reakcijsku smjesu koja sadrži 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH = 7 i 10 mM H₂O₂. Pipetirala sam 950 µl pufera (reakcijske otopine) u kivetu od kvarcnog stakla i dodala 50 µl ekstrakta i mjerila pad apsorbancije pri valnoj duljini od 240 nm uslijed degradacije vodikovog peroksida svakih 10 sekundi tijekom 10 sekundi. Aktivnost CAT izražavala sam prema formuli i izrazila u µmol razgrađenog vodikovog peroksida po minuti po gramu suhe tvari (Aebi 1984):

$$CAT = \frac{\Delta A_{s.v.} \times 6 \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uz.} \times v \times l \times m} \quad [\mu\text{mol/min g}_{\text{su.t.}}]$$

A_{s.v.} - srednja vrijednost promjene apsorbancije u 10 s

6 - faktor s kojim se množi A_{s.v.} da bi se rezultat izrazio u minuti

V_{r.s.} - volumen reakcijske smjese (1 ml)

F.R. - faktor razrjeđenja uzorka (1)

V_{uz.} - volumen uzorka

₂₄₀ - 40 mM⁻¹ cm⁻¹

m - masa suhe tvari (g_{su.t.})

3.2.4.3. Određivanje aktivnosti askorbat-peroksidaze (APOX)

Za mjerenje aktivnosti APOX koristila sam reakcijsku smjesu koja je sadržavala 50 mM kalij-fosfatnog pufera, pH = 7, 0,1 mM EDTA i 0,1 mM askorbata. Vodikov peroksid (10 µl 14%-tne otopine H₂O₂) i 10 µl askorbata dodala sam u reakcijsku smjesu neposredno prije mjerenja. Na 800 µl ove otopine odnosno pufera dodala sam 180 µl ekstrakta i svake sekunde tijekom 15 sekundi mjerila pad apsorbancije pri valnoj duljini od 290 nm koji nastaje uslijed oksidacije askorbata. Aktivnost APOX izračunala sam prema formuli i izrazila kao µmol oksidiranog askorbata po minuti po gramu suhe tvari (Nakano i Asada 1981):

$$\text{APOX} = \frac{\Delta A_{s.v.} \times 60 \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uz.} \times \epsilon \times l \times m} \quad [\mu\text{mol/min g}_{su.t.}]$$

A_{s.v.} - srednja vrijednost promjene apsorbancije u 1 s

60 - faktor s kojim se množi A_{s.v.} da bi se rezultat izrazio u minuti

V_{r.s.} - volumen reakcijske smjese (1 ml)

F.R. - faktor razrjeđenja uzorka (1)

V_{uz.} - volumen uzorka

ϵ_{290} - 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹

m - masa suhe tvari (g_{su.t.})

3.2.4.4. Određivanje aktivnosti pirogalol-peroksidaze (POX)

Za mjerenje aktivnosti POX koristila sam reakcijsku smjesu koja je sadržavala 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera, pH = 7, i 126 mg pirogalola. U 950 µl takoreakcijske smjese u plastičnoj kiveri dodala sam 50 µl ekstrakta i 5,5 µl 30%-tne otopine H₂O₂. Mjerila sam povećanje apsorbancije pri valnoj duljini 430 nm, koje nastaje zbog stvaranja purpurogalina, svakih 10 sekundi tijekom 2,5 minute. Aktivnost POX izračunala sam prema sljedećoj formuli i izrazila kao µmol purpurogalina po minuti po gramu suhe tvari (Knörzer i sur. 1996):

$$POX = \frac{\Delta A_{s.v.} \times 6 \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uz.} \times V \times l \times m} \quad [\mu\text{mol/min g}_{\text{su.t.}}]$$

$A_{s.v.}$ - srednja vrijednost promjene apsorbancije u 10 s

6 - faktor s kojim se množi $A_{s.v.}$ da bi se rezultat izrazio u minuti

$V_{r.s.}$ - volumen reakcijske smjese (1 ml)

F.R. - faktor razrjeđenja uzorka

$V_{uz.}$ - volumen uzorka

ϵ_{430} - 2,5 mM⁻¹ cm⁻¹

l - duljina optičkog puta (1 cm)

m - masa suhe tvari (g_{su.t.})

3.3. OBRADA REZULTATA

Rezultate prirasta broja listića i enzimskih mjerenja sam prikazala kao srednju vrijednost od najmanje osam replika \pm standardna pogreška. Dobivene podatke sam međusobno usporedila pomoću testa "Duncan's New Multiple Range Test" (DNMRT) (Duncan 1955) koristeći računalni program Statistika 7.1 (StatSoft Inc., SAD). Pri tumačenju rezultata statističke obrade značajnom sam smatrala razliku na razini $P < 0.05$.

4. REZULTATI

4.1. MAKROSKOPSKI IZGLED VODENE LEŠE NA HRANJIVOJ PODLOZI S DODATKOM KADMIJA I CINKA

Na temelju makroskopskih pokazatelja vidljivo je da je kadmij vrlo toksičan metal za vodenu lešu. Dok je u kontrolnom uzorku biljka prvi puta počela pokazivati znakove žuenja tek 8. dana i to samo u jednoj tikvici od 8 replika, biljke na podlozi s kadmijem u koncentraciji 10 μM počele su žutjeti već 6. dana i ta je pojava bila vidljiva u svih 8 tikvica (replika) te se do kraja 15. dana broj požutjelih biljaka znatno povećao (slika 1 a, b). Žuenje listića pojavilo se prvo na rubu listića i ono se postupno širilo prema sredini dok cijeli listići nisu požutjeli.

Nadalje, biljke koje su rasle na podlozi s dodatkom kadmija bile su uočljivo manje veličine u odnosu na kontrolu, te su kolonije najčešće sadržavale samo dvije biljke.

U ostalim uzorcima koji su sadržavali cink u koncentraciji 100 μM i 200 μM , zatim oba metala (kadmij i cink) u koncentracijama 100 μM cinka i 10 μM kadmija te 200 μM cinka i 10 μM kadmija, prvo žuenje biljaka primijetila sam 8. dana s malim razlikama u broju žutih biljaka. Pokazalo se da je uzorak sa cinkom prisutnim u koncentraciji 100 μM (slika 1 c) i uzorak koji je sadržavao kadmij sa cinkom koncentracije 200 μM (slika 1 f) imao manji uinak na biljke (primijećene su samo tri žute biljke u tri replike) u usporedbi sa cinkom u koncentraciji 200 μM (slika 1 d) i kombinacijom kadmija i cinka koncentracije 100 μM (slika 1 e) u kojima su požutjele biljke primijećene u većem broju tikvica (replika).

Od 10. dana svi tretmani su prouzrokovali žuenje biljaka u svim replikama. Ta pojava nije bila uočena jedino u kontrolnim kulturama gdje su biljke bile na optimalnoj hranjivoj podlozi bez dodatka istraživanih tvari. Blago žuenje biljaka primijećeno je u samo dvije replike i do kraja 15. dana su se biljke gotovo u cijelosti održale bez pojave kloroze.

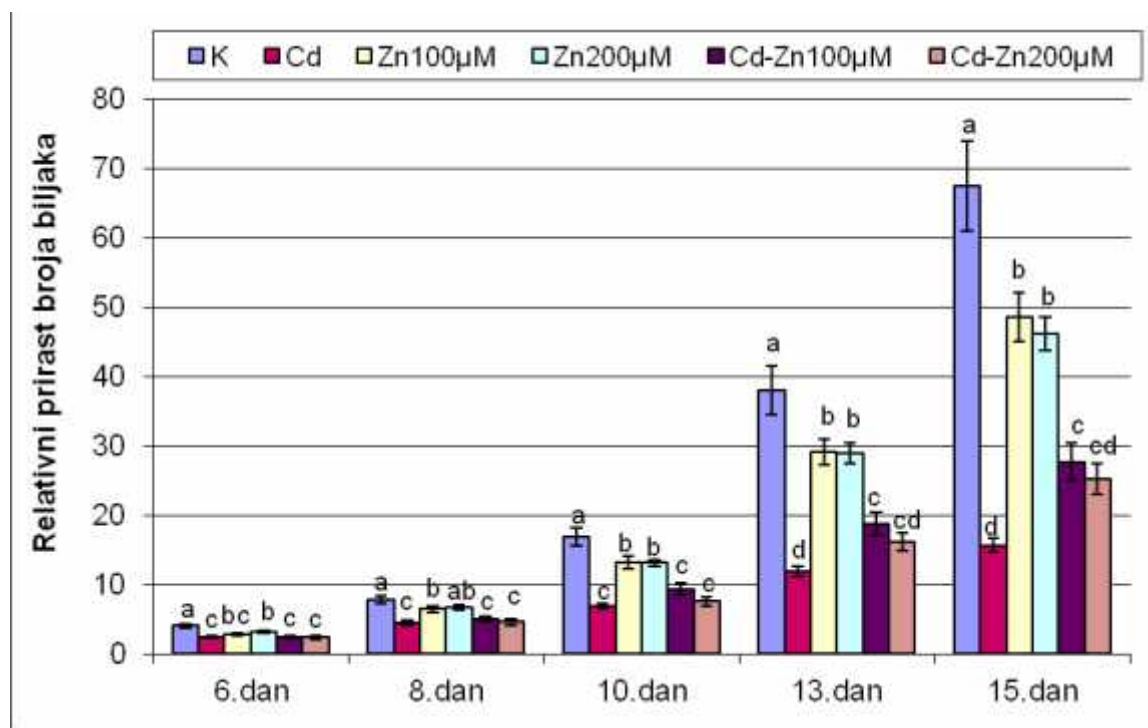


Slika 2. Kultura vodene le e, *Lemna minor* L., a) kontrolne biljke, b) uzorak Cd 10 μ M, c) uzorak Zn 100 μ M, d) uzorak Zn 200 μ M, e) uzorak Cd 10 μ M i Zn 100 μ M, f) uzorak Cd 10 μ M i Zn 200 μ M.

4.2. RELATIVAN PRIRAST BROJA BILJAKA

Prilikom prvog promatranja eksperimenta (3.dan) nije bilo statistički značajnih rezultata stoga podaci nisu prikazani grafički. Međutim, od šestog dana su bile vidljive izrazite promjene prirasta vodene leće, te razlike u rastu i razvoju između uzoraka tretiranih kadmijem i cinkom te netretiranog uzorka, tj. kontrole (K). Kadmija ($10 \mu\text{M}$) je u odnosu na kontrolni uzorak progresivno smanjivao rast vodene leće. Isto tako, u tretmanu koji je sadržavao kadmij s dodatkom $100 \mu\text{M}$ ili $200 \mu\text{M}$ cinka, kadmij je djelovao nepovoljno po biljku, ali prirast je ipak bio veći u usporedbi s tretmanom koji je sadržavao samo kadmij. Uzorci koji su bili tretirani samo sa cinkom ($100 \mu\text{M}$ i $200 \mu\text{M}$) smanjivali su prirast u odnosu na kontrolu, ali to smanjenje nije bilo toliko izraženo kao ono uzrokovano kadmijem. Redoslijed prirasta na pojedinim hranjivim podlogama bio je ovakav:

$K > \text{Zn } 100 \mu\text{M} > \text{Zn } 200 \mu\text{M} > \text{Cd-Zn } 100 \mu\text{M} > \text{Cd-Zn } 200 \mu\text{M} > \text{Cd } 10 \mu\text{M}$.



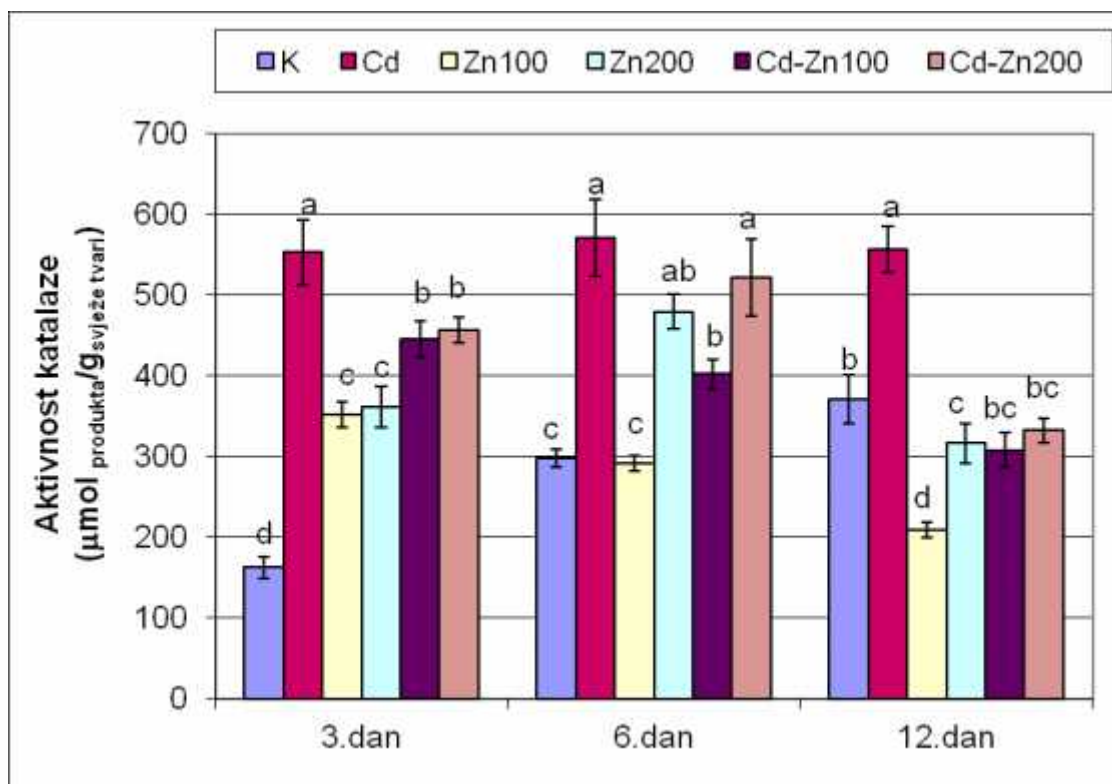
Slika 3. Prirast broja biljaka vodene leće *L. minor* (6. dana, 8. dana, 10. dana, 13. dana i 15. dana) uzgajanih na kontrolnoj hranjivoj podlozi i na podlogama s dodatkom kadmija i cinka (kontrola (K), Cd $10 \mu\text{M}$, Zn $100 \mu\text{M}$, Zn $200 \mu\text{M}$, Cd $10 \mu\text{M}$ + Zn $100 \mu\text{M}$, i Cd $10 \mu\text{M}$ + Zn $200 \mu\text{M}$). Oznake na stupcima pokazuju standardnu pogrešku. Vrijednosti prikazane stupcima označenim s različitim slovima se statistički značajno razlikuju ($P < 0.05$).

4.3. AKTIVNOST ANTIOKSIDACIJSKIH ENZIMA

4.3.1. Aktivnost katalaze

Rezultati mjerene aktivnosti katalaze u biljnim ekstraktima koji su uzeti 3. dana pokusa pokazali su da je aktivnost tog enzima bila najviša u uzorku tretiranom s 10 μM kadmijem. Nakon duljeg vremenskog perioda izlaganja biljke tom metalu (slika 2) katalaza je i nadalje pokazivala visoku aktivnost, ali se ona u nastavku pokusa nije više mijenjala. Trećeg dana pokusa izme u uzoraka koji sadrže cink u koncentraciji 100 μM i cink 200 μM , nije primijećena statistički značajna razlika u aktivnosti katalaze, kao niti izme u uzoraka tretiranih s kadmijem i cinkom (100 μM) i kadmijem i cinkom (200 μM).

Šestog dana pokusa katalaza je pokazala statistički značajan porast aktivnosti u tretmanu s 200 μM cinkom u odnosu na tretman sa 100 μM cinkom. Unatoč tome, značajne razlike u prirastu (slika 2) izme u tih dvaju tretmana šestog dana pokusa nije bilo. Isto tako, dok je aktivnost katalaze u tretmanu sa cinkom 100 μM s vremenom padala i na kraju 12. dana poprimila najnižu vrijednost u odnosu na ostale tretmane, tretman sa cinkom 200 μM je 6. dana doveo do porasta aktivnosti, a 12. dana je aktivnost značajno pala. Istu pravilnost promjene aktivnosti kroz dulji vremenski period su pokazali uzorci s kombinacijom kadmija i cinka (100 μM) i kadmija i cinka (200 μM) samo što su već na početku, 3. dana pokusa, imali veću vrijednost aktivnosti katalaze u odnosu na tretmane koji su sadržavali samo cink (100 i 200 μM) te u odnosu na kontrolu. Kontrola je 3. dana imala najnižu aktivnost katalaze u usporedbi sa svih pet tretmana. U nastavku pokusa vrijednost aktivnosti katalaze kontrolnog uzorka je postepeno rasla.



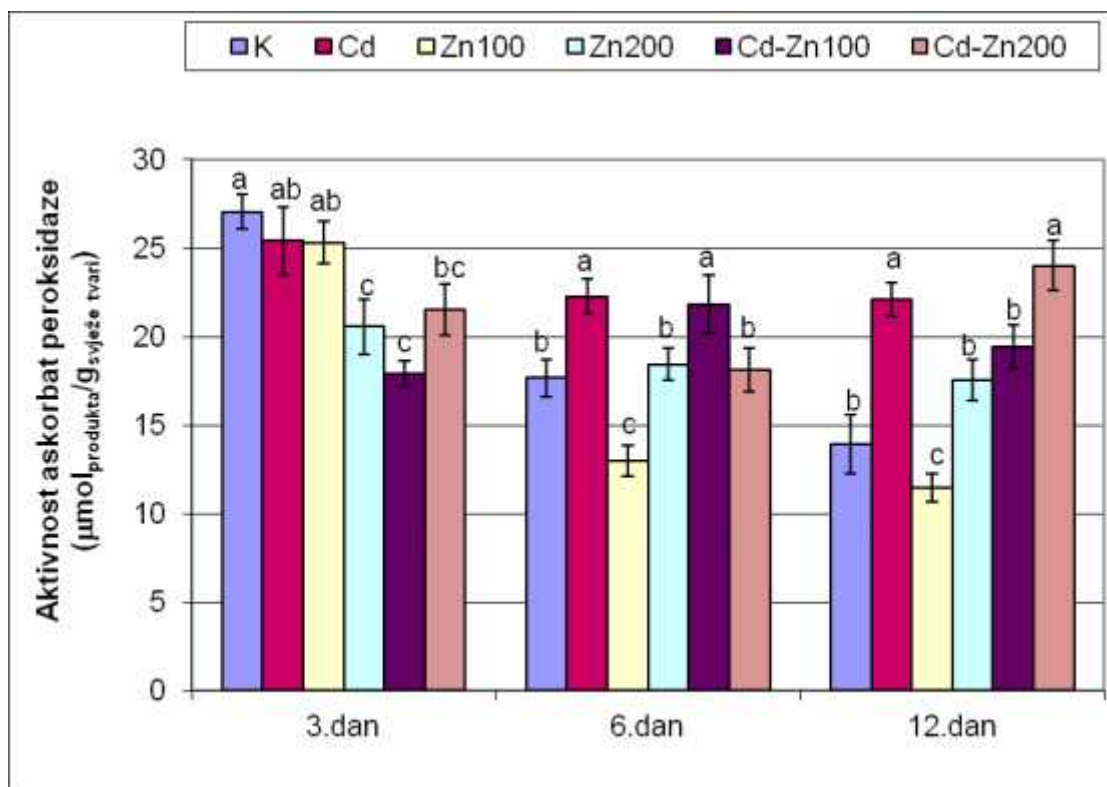
Slika 4. Aktivnost katalaze u ekstraktima vodene le e 3, 6, 12. dana (K – kontrola; Cd –uzorak s 10 μM Cd; Zn 100 – uzorak sa 100 μM Zn; Zn 200 – uzorak s 200 μM Zn; Cd-Zn 100 – uzorak s 10 μM Cd i 100 μM Zn; Cd-Zn 200 – uzorak s 10 μM Cd i 100 μM Zn). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od 8 replika \pm standardna pogreška. Vrijednosti prikazane stupcima oznaenim razliitim slovima se statisti ki zna ajno razlikuju ($P < 0.05$).

4.3.2. Aktivnost askorbat-peroksidaze

Određivanjem aktivnosti askorbat-peroksidaze u ekstraktima vodene leće uzete 3. dana pokusa utvrđeno je da je kontrola imala najvišu aktivnost, međutim u drugom dijelu pokusa (6. i 12. dana pokusa) vrijednost je padala. Najnižu aktivnost izmjerila sam u uzorku tretiranom kadmijem i cinkom (100 μM) gdje je aktivnost tijekom trajanja pokusa dosta varirala - šestog je dana malo porasla, a zatim se opet smanjila. Trećeg dana nije bilo statistički značajne razlike u aktivnosti askorbat-peroksidaze između tretmana kadmijem 10 μM i cinkom (100 μM) kao niti između tretmana cinkom 200 μM i kombinacijom kadmija i cinka (100 μM).

Biljke koje su rasle na podlozi koja je sadržavala kadmij imale su najmanji prirast (slika 2) međutim mjerena aktivnost askorbat-peroksidaze 3. dana je bila nešto niža u odnosu na kontrolni uzorak. Dužim vremenskim periodom djelovanja kadmija na biljku aktivnost enzima je zadržavala konstantno visoku aktivnost do kraja 12. dana. Slijedeći uzorak vodene leće tretirane cinkom 100 μM koji je inače odmah poslije kontrole imao najveći prirast biljaka (slika 2) pokazivao je nižu aktivnost askorbat-peroksidaze u odnosu na kontrolu i u usporedbi s njom postepeni pad aktivnosti do kraja 12. dana. Taj tretman je 6. i 12. dana u usporedbi sa svim tretmanima imao statistički značajnu najnižu aktivnost enzima. Isto tako, uzorak biljaka tretiranih sa cinkom 200 μM koji je u odnosu na tretman cinka 100 μM i kontrolni uzorak bio slabijeg prirasta (slika 2), imao je 3. dana još nižu aktivnost enzima u usporedbi s biljkama tretiranim sa 100 μM cinkom. U drugom dijelu pokusa (6. i 12. dana) aktivnost se još malo smanjila.

Preostali uzorci - tretirani kadmijem i cinkom 100 μM te kadmijem i cinkom 200 μM na početku pokusa su imali relativno nisku aktivnosti askorbat-peroksidaze. U nastavku pokusa je aktivnost enzima u tretmanu kadmij-cink 100 μM prvo 6. dan, porasla a onda 12. dan opala, dok je tretman kadmijem i cinkom 200 μM pokazao obrnuti redoslijed aktivnosti enzima.

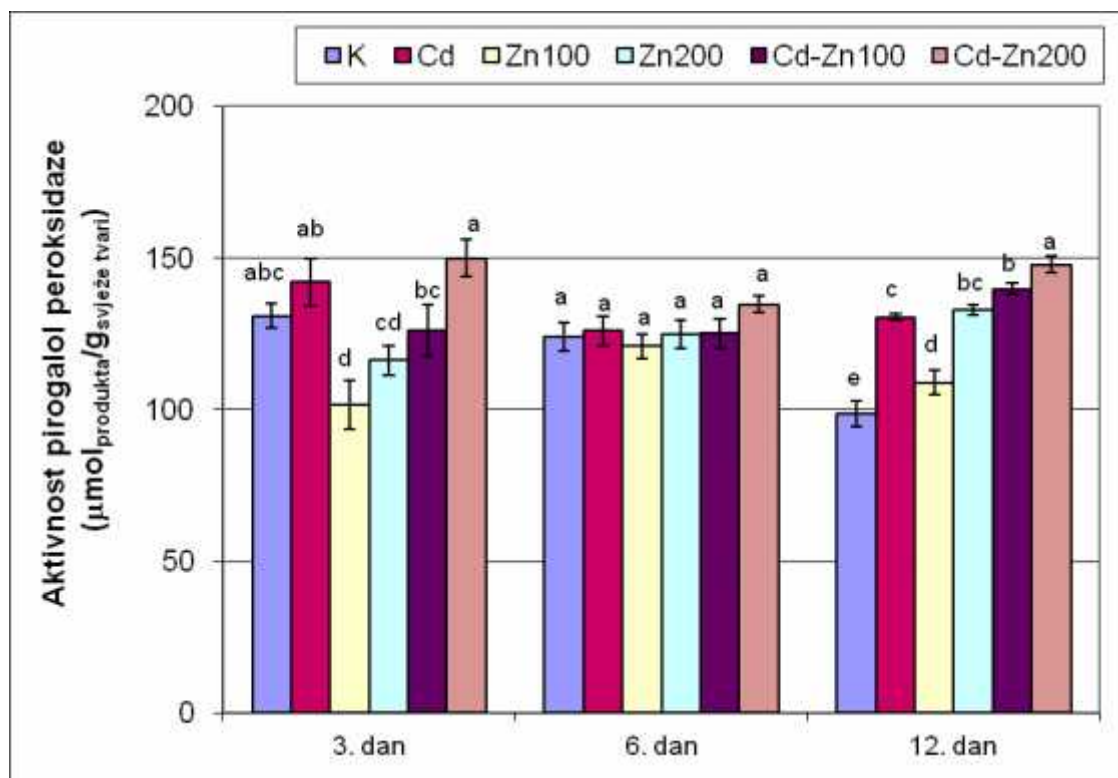


Slika 5. Aktivnost askorbat-peroksidaze u ekstraktima vodene le e 3, 6, 12. dana (K – kontrola; Cd –uzorak s 10 μM Cd; Zn 100 – uzorak sa 100 μM Zn; Zn 200 – uzorak s 200 μM Zn; Cd-Zn 100 – uzorak s 10 μM Cd i 100 μM Zn; Cd-Zn 200 – uzorak s 10 μM Cd i 100 μM Zn). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od 8 replika \pm standardna pogreška. Vrijednosti prikazane stupcima označanim različitim slovima se statistički značajno razlikuju ($P < 0.05$).

4.3.3. Aktivnost pirogalol-peroksidaze

Određivanjem aktivnosti pirogalol-peroksidaze u ekstraktima biljaka uzetima 3. dana pokusa, statistički značajnu najvišu aktivnost enzima u odnosu na kontrolu pokazivao je tretman kadmijem s dodatkom cinka (200 μM) koji je do kraja 12. dana zadržao konstantno visoku vrijednost. Malo nižu aktivnost imali su enzimi u uzorku tretiranom s kadmijem 10 μM . Taj je uzorak inače bio s najmanjim prirastom biljaka (slika 2). Međutim, vrijednost aktivnosti enzima se nije značajnije mijenjala do kraja 12. dana. U tretmanu vodene leće na podlozi koja je sadržavala 100 μM cinka koji je prirast inače bio najviši odmah iza kontrolnog uzorka, 3. dana je izmjerena najniža aktivnost pirogalol-peroksidaze. Aktivnost se 6. dana izjednačila s ostalim tretmanima, a do kraja 12. dana vratila se na svoju početnu aktivnost.

Aktivnost pirogalol-peroksidaze 6. dana nije pokazivala nikakve statistički značajnije razlike između tretmana, međutim do kraja 12. dana najnižu aktivnost pokazivala je kontrola. Biljke tretirane sa cinkom 200 μM imale su blagi porast u aktivnosti enzima kroz duži vremenski period (6. i 12. dana pokusa). Isto vrijedi i za tretman kadmij-cink 100 μM , koji je imao znatno manji prirast biljaka u odnosu na isti cink, ali je zato aktivnost enzima bila veća.



Slika 6. Aktivnost pirogalol peroksidaze u ekstraktima vodene le e 3, 6, 12. dana (K – kontrola; Cd –uzorak s 10 μ M Cd; Zn 100 – uzorak s 100 μ M Zn; Zn 200 – uzorak s 200 μ M Zn; Cd-Zn 100 – uzorak s 10 μ M Cd i 100 μ M Zn; Cd-Zn 200 – uzorak s 10 μ M Cd i 100 μ M Zn). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od 8 replika \pm standardna pogreška. Vrijednosti prikazane stupcima ozna enim razli itim slovima se statisti ki zna ajno razlikuju ($P < 0.05$).

5. RASPRAVA

5.1. U INAK KADMIJA I CINKA NA IZGLED I PRIRAST VODENE LE E

Vodena le a je plutaju a slatkovodna biljka koja prima vodu i hranjive tvari cijelom svojom donjom površinom pa je zbog toga osjetljiva na promjene osmotske vrijednosti (Frick i Golt 1995) kao i na prisutnost tvari koje na njezin metabolizam djeluju štetno i toksi no. Teški metali su u odre enoj koli ini stalno prisutni u vodenoj okolini u koju dospijevaju ili prirodnim putem ili djelovanjem ovjeka. Neki od teških metala su u malim koli inama (u „tragovima“) biljkama potrebni za normalan rast i razvoj pa ih nazivamo esencijalni mikroelementi. Me utim, u velikim koli inama mogu izazvati razne toksi ne u inke (Dietz i sur. 1999, Pohlmeier 1999). Rezultate istraživanja toksi nosti metala u biljkama objavili su mnogi autori (Bollard i sur. 1966, Brown i sur. 1975, Foy i sur. 1978 i Gerloff 1963). U radu sam istraživala u inak cinka koji je esencijalni element za rast i razvoj biljaka te kadmija koji biljkama nije potreban za metabolizam i za njih je štetan. Pri tom sam cink i kadmij dodavala u hranjivu podlogu zasebno i u kombinaciji.

Prou avaju i rast vodene le e tijekom 15 dana na hranjivim podlogama koje su sadržavale kadmij u koncentraciji 10 μM , cink u koncentracijama 100 μM i 200 μM te kombinaciju kadmija i cinka, primijetila sam vrlo zna ajne fiziološke i morfološke promjene biljaka.

Hranjiva podloga u koju je dodan kadmij u koncentraciji 10 μM najnepovoljnije je utjecala na rast i razvoj biljaka. Prvi vidljivi simptomi toksi nog djelovanja kadmija bili su poticanje starenja listi a vodene le e što sam zaklju ila na temelju pojave kloroze (slika 2 b). Kloroza je nastupila šestog dana od po etka pokusa, pri emu je došlo do promjene boje biljaka koje su po ele vidljivo žutjeti, a broj žutih listi a se iz dana u dan sve više pove avao. U istraživanjima drugih autora (Fodor 2002) spominje se da je u kopnenih biljaka prisutnost kadmija uzrok snažne inhibicije prijenosa željeza iz korijena u izdanak, a posljedica je kloroza. Pretpostavljam da na isti na in kadmij može djelovati na vodenu le u, iako je zbog gra e same biljke prisutan prijenos hranjivih tvari na manje udaljenosti. Kadmij koji u e u stanicu djeluje na metabolizam na dva na ina: može se vezati na specifi ne grupe proteina i

lipida pri čemu narušava njihovu normalnu strukturu i funkciju. To se odražava na metabolizam stanice, naročito ako su ti proteini po svojoj ulozi enzimi. Kadmij također može uzrokovati povećanje količine reaktivnih oblika kisika i uzrokovati oksidacijski stres. Mehanizam kojim se taj učinak ostvaruje je inhibicija djelovanja antioksidacijskog sustava (Cseh 2002). Oba opisana u činka mogu doprinijeti pojavi kloroze – prvi mehanizam umanjuje aktivnost enzima uključenih u biosintezu klorofila, a drugi uzrokuje oksidaciju same molekule klorofila. Prema rezultatima istraživanja u činka kadmija na vodenu kugu *Elodea canadensis* poznato je da kadmij utječe na morfološki izgled mladih listića tako da inhibira diobu stanica i na taj način smanjuje stopu razmnožavanja. U istom je istraživanju utvrđeno da je kadmij spriječio diobu i rast kloroplasta, oštetio organele i tilakoidni sustav i smanjio fotosintetsku aktivnost (Dalla Vecchia i sur. 2005).

Smanjenje količine klorofila u tkivu dovodi do pada stope fotosinteze, a time i do smanjenja rasta biljke. Kadmij je od 6. dana do kraja pokusa (15. dana) uzrokovao značajnu inhibiciju rasta biljaka u odnosu na kontrolu (slika 3). Naime, poznato je da kadmij smanjuje proliferaciju stanica (Rosas i sur. 1984, cit. Das i sur. 1997). Kao moguć i mehanizam takvog djelovanja spominje se u činka kadmija na narušavanje strukture i funkcije mikrotubula u stanicama, što je dokazano istraživanjima na stanicama korijena kukuruza (Enu i sur. 2000, cit. Fodor 2002). Kadmij također reducira rast stanične stijenke (Poschenrieder i sur. 1989). Naime, stresni čimbenici, uključujući i prisutnost teških metala, povećavaju aktivnost peroksidaze u području stanične stijenke i u kopnenih biljaka stimuliraju lignifikaciju. Isto tako, povećava se količina glikoproteina - strukturnih proteina stanične stijenke koji također doprinose čvrstoći stanične stijenke i uzrokuju smanjenje stope rasta stanice (Czeh 2002). Budući da su rezultati pokazali da se većina kolonija sastoji od samo dvije biljke došla sam do zaključka da je kadmij svojom toksičnošću jako smanjivao razmnožavanje biljaka te prouzročivao raspadanje kolonija. Taj je učinak djelovanja teških metala na vodenu leću opisao Szabados (Szabados 1983, cit. Fodor 2002). Osim toga, listići i na hranjivoj podlozi s kadmijem su bili značajno manje veličine u odnosu na kontrolu.

U uzorcima vodene leće tretiranim s različitim koncentracijama cinka (100 µM i 200 µM) primijetila sam da je do žuenja biljaka došlo 8. dana i to u manje od polovice od ukupnog broja tikvica (replika) u tretmanu. Takav rezultat dokazuje da je cink u usporedbi s

kadmijem povoljnije djelovao na razvoj vodene leće. On je prije svega esencijalni element koji sudjeluje u rastu biljke, međutim u visokim koncentracijama može biti toksičan (Shier 1994 i Welch 1995). Naime, glavni učinak previsoke koncentracije cinka je inhibicija rasta (Collins i sur. 1981). Van Assche (1973) je objavio da visoka koncentracija cinka inhibira metaboličke aktivnosti.

U odnosu na kontrolni uzorak, biljke koje su rasle na podlozi s dodatkom cinka (100 μM i 200 μM) pokazivale su nižu stopu rasta, ali rast je ipak bio značajno viši u odnosu na tretmane kadmijem. Uspoređujući i biljke tretirane 100 μM cinkom i 200 μM cinkom razlike u rastu su unutar dva tjedna pokusa bile vrlo male, bez statističke značajnosti. Pri tom je cink u koncentraciji 100 μM povoljnije djelovao na razvoj biljke. U tom tretmanu prvu pojavu kloroze uočila sam kasnije u odnosu na tretman s 200 μM cinka gdje je bilo više žutih biljaka. Naime, u dosadašnjim istraživanjima dokazano je da se unutarstani na koncentracija cinka u biljkama sporo smanjuje, tj. ostaje konstantna tijekom duljeg razdoblja nakon premještanja biljaka na hranjivu podlogu bez cinka pa proces oporavka biljke traje dugo (Drost i sur. 2007).

Zadnja dva uzorka tretirana kadmijem (10 μM) uz dodatak 100 μM cinka, odnosno 200 μM cinka pokazala su malo veći rast biljke u odnosu na uzorak tretiran samo s kadmijem, bez dodatka cinka. Međutim, biljke su bile slabijeg rasta u odnosu na uzorke tretirane samo sa cinkom, te u usporedbi s kontrolnim uzorkom (slika 3). Žutljenje biljaka počinje se javljati od 8. dana i svakim danom se pojačavalo. Biljke su bile srednje veličine te se moglo primijetiti kako je brzina starenja odnosno pojava kloroze na hranjivoj podlozi s dodatkom kadmija i 200 μM cinka bila manje izražena u odnosu na biljke tretirane kadmijem i 100 μM cinkom (slika 2 e i f). Takav rezultat ukazuje na mogućnost da je viša koncentracija cinka (200 μM) umanjila učinak kadmija na biljke.

Prema rezultatima drugih autora, u istovremenom tretmanu kadmijem i cinkom dolazi do snažne kompeticije između cinka i kadmija, tj. njihovog antagonističkog djelovanja (Powell 2000, Zago i sur. 2001). Ulazak kadmija u biljku je pri tom manji nego u tretmanima samo s kadmijem, a umjesto kadmija ulazi određena količina cinka. Budući da su kadmij i cink metali II grupe periodnog sustava elemenata, kadmij može vrlo lako zamijeniti cink u procesima ovisnim o cinku (Siedlecka 1995) i narušavati ih. Kadmij se može vezati na SH-skupine membranskih proteina stvarajući na taj način disulfidne veze koje narušavaju

strukturu proteinskih kanala a u membranama i prouzrokuju „curenje“ i gubitak iona te narušavanje normalnog ulaska esencijalnih elemenata (Prasad 1995a) u stanicu preko membrane. Me utim, cink, osobito kada je prisutan u povišenoj koncentraciji, ima sposobnost zamijeniti kadmij u njegovom vezanju za membranske proteine ili aktivna mjesta enzima, te na taj na in ublažiti njegovo djelovanje (Chvapil 1973). Stoga cink može svojim ublažavaju im djelovanjem na kadmijevu toksi nost umanjiti inhibiciju sinteze fotosintetskih pigmenata i održati njihovu normalnu razinu. Prema tome, cink utje e ne samo na normalni razvoj kloroplasta ve održava i aktivnost fotosintetskog sustava. I na pokusima s vodenim biljkama je dokazano da cink, kontroliraju i razinu ulaska kadmija u organizam (Aravind i sur. 2003), može zamjenjivati toksi ni metal kadmij i ublažiti na taj na in njegovo djelovanje na tilakoidne membrane i fotosintetski aparat koji se u njima nalazi. U dosadašnjim istraživanjima djelovanja kadmija u kombinaciji s razli itim koncentracijama cinka (10, 50, 100 i 200 μM) na biljku *Ceratophyllum demersum* eksperimentalni podaci su pokazali da je cink najviše smanjivao akumulaciju kadmija kada je bio prisutan u najvišoj koncentraciji - 200 μM (Aravind i Prasad 2005).

Podaci dobiveni kao rezultat ovog dijela pokusa upu uju na to da je u uzorcima biljaka tretiranih kadmijem i cinkom utvr en blaži u inak kadmija u usporedbi s tretmanom kadmijem bez dodatka cinka. Zato su uzorci tretirani kombinacijom cinka i kadmija bili boljeg rasta i dužeg životnog vijeka u odnosu na uzorak tretiran samo s kadmijem. Tretman cinkom odgodio je po etak starenja (žu enja) listova, a oblik i veli ina biljke nije se zna ajno promijenila (slika 2 f).

5.2. DJELOVANJE KADMIJA I CINKA NA AKTIVNOST ANTIOKSIDACIJSKIH ENZIMA

Oksidacijski stres prouzrokovan stvaranjem ROS kao što su superoksidni radikali, singletni kisik, vodikov peroksid i hidroksilni radikali, uzrokuje ošte enja tkiva nakon izlaganja biljaka razli itim stresnim uvjetima (Salin 1987, Foyer i sur. 1994, Clijsters i sur. 1999, Sanitá di Toppi i Gabbrielli 1999). Ovi kisikovi oblici su visoko reaktivni i ošte uju lipidni dvosloj membrane, proteine, pigmente i nukleinske kiseline uzrokuju i redukciju rasta i

produktivnosti, a mogu dovesti do smrti biljke (Foyer i sur. 1994). Biljke su razvile razne zaštitne mehanizme kako bi uklonile ili smanjile oštećenja uzrokovana ROS. Jedan od zaštitnih mehanizama je aktivnost antioksidacijskih enzima. Enzimi katalaza (CAT) i peroksidaze (APOX i POX), koji su istraživani u ovom radu, dio su antioksidacijskog sustava biljke i sudjeluju u uklanjanju vodikovog peroksida (Tanaka i sur. 1982).

U pokusu u kojem je određivana aktivnost enzima katalaze mjerenja su provedena 3., 6. i 12. dana. Prilikom prvog mjerenja nakon samo tri dana rasta biljaka aktivnost enzima katalaze bila je iznimno visoka u uzorku vodene lepe tretirane 10 μ M kadmijem. Nadalje, kroz dulji vremenski period (6. dana i 12. dana pokusa) aktivnost katalaze je zadržavala konstantno visoku vrijednost, odnosno nije se promijenila od trećeg dana pokusa. Naime, dosadašnja istraživanja pokazala su da nakon kratkotrajnog tretmana (24 h) vodene lepe kadmijem dolazi do smanjenja aktivnosti katalaze (Somashekaraian i sur. 1992, Stroiški 1999) u usporedbi s kontrolom ili da nema značajne razlike (Razinger i sur. 2008). U radu Razingera i sur. (2008) kadmij (10 μ M) nakon 24 sata tretmana nije uzrokovao značajnu promjenu aktivnosti katalaze i askorbat-peroksidaze. Treba naglasiti da je djelovanje kratkotrajnih tretmana istraživano na podlozi bez organskih dodataka dok sam ja u svojem radu koristila hranjivu podlogu koja je sadržavala saharozu i asparagin. Stoga se, osim duljinom tretmana, razlike u aktivnosti katalaze dobivena u istraživanjima drugih autora i mojem pokusu mogu objasniti korištenjem različitih hranjivih podloga.

U istom laboratoriju u kojem sam izradila svoj rad nedavno je provedeno istraživanje djelovanja kadmija i cinka korištenjem hranjive podloge po Steinbergu (ISO, 2001) koja nema organskih dodataka. Ta su istraživanja pokazala da kadmij koncentracije 10 μ M u prvom tjednu pokusa nije uzrokovao statistički značajnu promjenu aktivnosti katalaze i askorbat-peroksidaze. Značajno povišenje aktivnosti enzima uočeno je tek sedmog dana pokusa (neobjavljeni rezultati). Stoga mogu pretpostaviti da dugotrajno tretiranje biljaka kadmijem može određenim mehanizmom narušavati homeostazu u stanici i time indirektno izazvati oksidacijski stres koji zatim prouzroči i aktivaciju antioksidacijskog sustava. Jačina aktivacije antioksidacijskog sustava ovisna je o duljini izlaganja kadmiju i o sastavu hranjive podloge. Tkalec i sur. (2008) su dokazali da je vodena lepa na Pirson-Seidelovoj podlozi nakon 12 dana tretiranja kadmijem (10 μ M) pokazala visoku aktivnost enzima CAT, APOX i POX.

Stoga visoka aktivnost katalaze koju sam izmjerila u vodenoj le i najvjerojatnije ukazuje da je kadmij odre enim mehanizmima uzrokovao oksidacijski stres. Naime, poznato je da kadmij ne producira ROS direktno, tj. ne sudjeluje u pretvorbi relativno stabilnih molekula kisika u snažne radikale, ve indirektnim djelovanjem na enzime antioksidacijskog sustava utje e na nastanak ROS tako što zamjenjuje esencijalni metal koji je u ulozi kofaktora tih enzima (Briat 2002).

Aktivnost enzima katalaze u kontrolnom uzorku bila je najniža 3. dana pokusa, a do kraja 12. dana jedino je kontrola pokazivala kontinuirani porast aktivnosti dok su tretmani sa cinkom (100 μM i 200 μM) imali oko 50% višu aktivnost katalaze u odnosu na kontrolu 3. dana pokusa ali zna ajno nižu u odnosu na tretman kadmijem. Aktivnost enzima u uzorcima tretiranim cinkom najviše se smanjila. Nakon dodatka kadmija i cinka u kombinaciji u hranjivu podlogu biljke su reagirale višom aktivnoš u antioksidacijskih enzima u odnosu na tretmane samo sa cinkom (100 i 200 μM). Me utim, aktivnost je bila niža u usporedbi s biljkama tretiranim samo s kadmijem. Cink, kao što sam ve spomenula, je element koji je nužan za normalan rast i metabolizam biljaka. Ima važnu ulogu u aktivaciji enzima i uklju en je u biosintezu nekih enzima (Cakmak 2000). Iz ovog pokusa vidljivo je da cink ima zna ajni u inak na sprje avanje toksi nog djelovanja kadmija. Iz tog su razloga uzorci biljaka tretiranih kombinacijom kadmija i cinka imali višu aktivnost katalaze u usporedbi s biljkama tretiranim samo s cinkom (100 μM i 200 μM) te kontrolnom podlogom, ali ipak nižu od uzoraka tretiranih samo kadmijem. Ovi rezultati pokazuju da je u podlogu koja je zadržavala kadmij dodatak cinka djelovao na biljku tako da je ona reagirala manjim oksidacijskim stresom nego pri tretmanu samo s kadmijem (Aravind i Prasad 2003).

Dosadašnja istraživanja molekularnih mehanizama djelovanja kadmijevih iona na biljnu stanicu još nisu dala potpun odgovor. U ranijim istraživanjima utvr eno je da stanice biljaka, u ovom slu aju stanice duhana u kulturi tkiva *in vitro*, mogu pove ati produkciju H_2O_2 nakon djelovanja divalentnih kationa, odnosno kadmija (Pisqueras i sur 1999). Pretpostavlja se da kadmij poti e aktivnosti NADPH-oksidade na stani noj membrani i na taj na in dovede do stvaranja superoksidnog radikala ($\text{O}_2^{\bullet -}$) koji se zatim uklanjaju uz SOD stvaraju i H_2O_2 , a njega razgra uje katalaza (Kawano i sur. 2001, Keller i sur. 1998, Torres i sur. 1998). Cink ima ulogu i u regulaciji proizvodnje ROS te održavanju homeostaze u stanicama (Powell

2000) pa se zaštitno djelovanje cinka temelji na inhibiciji aktivnosti membranske NADPH oksidaze (Cakmak i sur. 1988). Porast aktivnosti antioksidacijskih enzima djeluje na u inkovitiije uklanjanje ROS.

Poznato je da razli ite stresni imbenici (npr. hladno a, hipoksija, infekcija, ionski status, mehani ko ošte enje, one iš enje, teški metali, zra enje, solni stres i suša) utje u na peroksidaznu aktivnost. Budu i da je dokazano da je CAT u vodenoj le i *Lemna minor* manje osjetljivija na oksidacijski stres izazvan okolišnim imbenicima u usporedbi s APOX (Henriques i sur. 2004), primijetila sam da je prilikom prvog mjerenja aktivnosti askorbat-peroksidaza pokazala puno višu aktivnost i u kontrolnom uzorku i u uzorku sa cinkom (100 μ M i 200 μ M).

Askorbat-peroksidaza je tre eg dana pokusa pokazivala pove anu aktivnost uz prisutnost kadmija što ukazuje na njezinu veliku ulogu u detoksifikaciji vodikovog peroksida (Weckx i Clijsters 1996). Bitno je naglasiti da u usporedbi s katalazom peroksidaze imaju puno ve i afinitet za vodikov peroksid i nalaze se u svim stani nim odjeljcima. Druga istraživanja su isto pokazala porast peroksidaze djelovanjem kadmija.

Odre ivanjem aktivnosti enzima askorbat-peroksidaze vidljivo je da je 3. dana aktivnost enzima bila najviša u kontrolnom uzorku, a do kraja 12. dana je padala. Tretman kadmijem (10 μ M) uzrokovao je vrlo visoku aktivnost enzima 3. dana i do kraja 12. dana zadržao je takvu aktivnost. U uzorcima tretiranim razli itim koncentracijama cinka bila je uo ena blaga inhibicija aktivnosti. Dosadašnja istraživanja potvr uju da cink ima zna ajni u inak na djelovanje peroksidaza (Cuypers i sur. 1999) jer poti e cjelokupnu oksidaciju askorbata i glutaciona smanjuju i pri tome aktivnost, odnosno sadržaj askorbat-peroksidaze. Uzorci tretirani kadmijem uz dodatak cinka su pokazivali vrlo nestabilne vrijednosti aktivnosti enzima i jedini imali naznake porasta aktivnosti, ali u razli itim vremenima od po etka pokusa.

I pirogalol-peroskidaza pokazuje zna ajniju aktivnost u odnosu na katalazu 3. dana pokusa što ukazuje na to da peroksidaze imaju u inkovitiije zaštitno djelovanje u obrani od posljedica djelovanja kadmija. Najizrazitiju aktivnost enzima pokazuju biljke tretirane kadmijem i 200 μ M cinkom. U tom je tretmanu aktivnost bila konstantna tokom 12 dana. Poznato je da pirogalol-peroksidaza ima u kopnenih biljaka mogu u ulogu u lignifikaciji, tj.

sintezi lignina kojim stvara vrstu barijeru i umanjuje štetno djelovanje teških metala (Hegedüs i sur. 2001) i nekih drugih štetnih u inaka. Cink ima ograničeno djelovanje na metabolizam stanica korijena. i to je možda razlog zašto je aktivnost enzima u uzorku tretiranom cinkom (100 μ M) pokazivala najnižu vrijednost u po etnom mjerenju. Nekoliko istraživanja opisuje djelovanje POX u uvjetima oksidacijskog stresa uzrokovnog metalima (Mosquitos i sur. 1996, Garcia i sur. 1999, Prasad i sur. 1999). U tim je istraživanjima ustanovljeno da je pirogalol-peroksidaza u odnosu na druge enzime slabije osjetljiva na utjecaj kadmija. U mojem istraživanju je aktivnost enzima 6. dana ostala konstantna tj. u svim uzorcima je bila približno jednaka i povišena. Scheiber i sur. (1999) su protumačili djelovanje lignifikacije u endodermi korijena kopnenih biljaka pretpostavkom da je to obrambeni odgovor koji sprječava ulazak kadmija u stabljike zadržavajući ga izvan centralnog cilindra korijena. Na kraju pokusa (12. dana) smanjile su se samo aktivnosti enzima u kontrolnim biljkama i biljkama tretiranim cinkom koncentracije 100 μ M što bi moglo značiti da je u ta dva uzorka nastala najmanja količina vodikovog peroksida pa nije bila potrebna daljnja aktivacija enzima. Poticanje aktivnosti pirogalol peroksidaze je opći odgovor biljke na stres i nije specifičan za metale.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata istraživanja djelovanja metala kadmija i cinka na vodenu leu (*Lemna minor*) prisutnih u hranjivoj podlozi zasebno i u kombinaciji mogu se izvesti slijedeći zaključci:

1. Kadmij prisutan u hranjivoj podlozi u koncentraciji 10 μM uzrokovao je pojavu kloroze već šestoga dana pokusa. Aktivnost katalaze u odnosu na druge uzorke bila je izrazito povišena već trećeg dana i zadržala je visoku vrijednost do kraja pokusa (15. dana).
2. Cink prisutan u hranjivoj podlozi u koncentracijama 100 μM i 200 μM uzrokovao je žućenje biljaka 8. dana s neznatnim razlikama u prirastu. Međutim, aktivnosti enzima su se dugotrajnim tretiranjem biljke cinkom najviše smanjile.
3. U uzorcima koji su sadržavali kombinaciju kadmija (10 μM) i cinka (100 μM i 200 μM) žućenje biljaka počelo se javljati 8. dana te je do kraja pokusa uzorak s višom koncentracijom cinka pokazivao sporiji nastanak kloroze jer cink dodan u hranjivu podlogu ublažava učinak kadmija, što je vidljivo na temelju rasta i aktivnosti katalaze. Aktivnost enzima askorbat-peroksidaze je bila povišena u određenim tretmanima tek šestog dana pokusa, a aktivnost pirogalol-peroksidaze nije se značajno mijenjala.
4. Rezultati su pokazali da kadmij uzrokuje oksidacijski stres u biljci što dovodi do aktivacije antioksidacijskih enzima, prvenstveno katalaze. Cink, te kombinacija kadmija i cinka u hranjivoj podlozi također uzrokuju oksidacijski stres, ali u manjoj mjeri od kadmija.

7. LITERATURA

- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. Methods Enzymology 105, 121-126.
- Aravind, P. i Prasad, M.N.V. (2003). Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: A free floating freshwater macrophyte. Plant Physiol. Biochem. 41, 391-397.
- Aravind, P. i Prasad, M.N.V. (2005). Cadmium-zinc interactions in hydroponic system using *Ceratophyllum demersum*: adaptive plant ecophysiology, biochemistry and molecular toxicology. Braz. J. Plant Physiol. 17, 3-20.
- Asada, K. (1992). Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. Plant Physiol. 55, 235-241.
- Baker, A.J.M. (1978). Ecophysiological aspects of zink tolerance in *Silene maritima*. New Phytol. 80, 635-642.
- Bazzaz, F.A., Carson R.W. i Rolfe, G.L. (1974). The effect of heavy metals on plants: Part I. Inhibition of gas exchange in sunflower by Rb, Cd, Ni and Ti. Environ. Pollut. 7, 241-246.
- Bollard, E.G. i Butler, G.W. (1966). Mineral nutrition of plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 17, 77-112.
- Boniardi, N., Vatta, G., Rota, R., Nano, R. i Carrá, S. (1994). Removal of water pollutants by *Lemna gibba*. Chem. Engin. J. 54, B41-B48.
- Bradshaw, A.D. i McNeilly, T. (1981). Evolution and Pollution. Edward Arnold, London.
- Briat, J.-F. (2002). Metal ion-activated oxidative stress and its control. U: Inze, D. i Van Montagu, M. (urednici), Oxidative Stress in Plants. Tylor & Francis, Velika Britanija.
- Brown, J.C. i Jones, W.E. (1975). Heavy metal toxicity in plants. 1. A crisis in embryo, Commun. Soil Sci. Plant Anal. 6, 421-438.
- Cakmak, I. (2000). Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. New Phytol. 146, 185-205.
- Cakmak, I. i Marschner, H. (1988). Enhanced superoxide radical production in roots of zinc-deficient plants. J. Exp. Bot. 39, 1449-1460.

- Cakmak, I. i Marschner, H. (1988). Zinc-dependent changes in ESR signals, NADPH oxidase and plasma membrane permeability in cotton roots. *Plant Physiol.* 73, 182-186.
- Chvapil, M. (1973). New aspects in the biological role of zinc: a stabilizer of macromolecules and biological membranes. *Life Sci.* 13, 1041-1049.
- Clijsters, H., Cuypers A. i Vangronsveld J. (1999). Physiological responses to heavy metals in higher plants; defence against oxidative stress. *Naturforsch Z.* 54, 730-734.
- Collins, J.C. (1981). Zinc U: Lepp N.W. (urednik), The effect of heavy metal pollution on plants, Vol. 1 Applied Sci. Publishers, 145-170.
- Costa, G., Michaut, J-C., i Morel, J-L. (1994). Influence of cadmium on water relations and gas exchanges, in phosphorus deficient *Lupinus albus*. *Plant Physiol. Biochem.* 32, 105-114.
- Cseh, E. (2002). Metal permeability, transport and efflux in plants. U: Prasad, M.N.V. i Strzalka K. (urednici) *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Cuypers, A., Vangronsveld, J. i Clijsters, H. (1999). The chemical behaviour of heavy metals plays a prominent role in the induction of oxidative stress. *Free Rad. Res.* 31, 839-843.
- da Costa, A.C. i de Franca, P.F. (1998). Cadmium uptake by *Spirulina maxima*: Toxicity and mehanism. *World J. Microbiol. Biotechn.* 14, 579-581.
- Dalla Vecchia, F., La Rocca, N., Moro, I., De Faveri, S., Andreoli, C. i Rascio, N. (2005). Morophogenetic, ultrastructural and physiological damages suffered by submerged leaves of *Elodea canadensis* exposed to cadmium. *Plant Sci.* 168, 329-338.
- Das, P., Samantaray, S., i Rout, GR. (1997). Studies on cadmium toxyty in plants: a review. *Environ. Pollut.* 98, 29-36.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D. i Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 779-795.
- Daviscarter, J.G. i Shuman, L.M. (1993). Influence of testure and pH of baolinitic soils on zinc fractions and zinc uptake by peanuts. *Soil Sci.* 155, 376-384.
- Dietz, K.J., Baier, M. i Kramer, U. (1999). Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants, U: Prasad, M.N.V. i Hagemeyer (urednici), *Heavy Metal Stress in Plants - From Molecules to Ecosystems*, Springer-Verlag, Berlin, 73-98.

- Dirilgen, N. i Inel, Y. (1994). Effects of zink and copper on growth and metal accumulation in duckweed, *Lemna minor*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 53, 442-449.
- Drost, W., Matzke, M. i Backhaus, T. (2007). Heavy metal toxicity to *Lemna minor*: studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure. Chemosphere 67, 36-43.
- Duncan, D.B. (1955). Multiple range and multiple F-tests. Biometrics 11, 1-42.
- Ellis, B.G. i Knezek., B.D. (1972). Adsorption reactions of micro-nutrients in soils. U: Mortvedt, J.J., Giordano, P.M. i Lindsay, W.L. (urednici), Micronutrients in agriculture. Soil Sci. Soc. of Amer., 59-78. Madison, Wis.
- Ensley, H.E., Barber, J.T., Polito, M.A. i Oliver, A.I. (1994). Toxicity and metabolism of 2,4-dichlorophenol by the aquatic angiosperm *Lemna gibba*. Environ. Toxicol. Chem. 13, 325-331.
- Fodor, F. (2002). Physiological responses of vascular plants to heavy metals. U: Prasad, M.N.V. i Strzalka K. (urednici), Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Foy, C.D., Chaney R.L., i White, M.C. (1978). The physiology of metal toxicity in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 29, 511-566.
- Foyer, C.H., Lelandais, M. i Kunert, K.J. (1994). Photooxidative stress in plants. Plant Physiol. 92, 696-717.
- Frick, H. i Golt, C. (1995). Sensitivity of *Lemna minor* growth to osmotic potential and relative tolerance of its callus. J. Plant Physiol. 146, 718-724.
- Garcia, A., Baquedano, F.J., Navarro, P. i Castillo, F.J. (1999). Oxidative stress induced by copper in sunflower plants. Free Rad. Res. 31, 45-50.
- Gaspar, T., Penel, C., Hagege, D. i Greppin, H. (1991). Peroxidases in plant growth, differentiation and developmental processes. U: Lobarzewski, J., Greppin H., Penel C. i Gaspar Th. (urednici): Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases, 249-280, University M. Currie-Sklodowska, Lublin, Poljska and University of Geneva, Ženeva, Švicarska.
- Gerloff, G.C. (1963). Comparative mineral nutrition of plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 14, 107-124.

- Gil, J., Moral, R., Gómez, I., Naverro-Pedreño, J. i Mataix, J. (1995). Effect of cadmium on physiological and nutritional aspects of tomato plant. I - chlorophyll (a and b) and carotenoids. *Fresenius Envir. Bull.* 4, 430-435.
- Haghiri, F. (1973). Cadmium uptake by plants. *Environ. Qual.*, 2, 93-96.
- Hegedüs, A., Erdei, S. i Horváth, G. (2001). Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Sci.* 160, 1085-1093.
- Henriques, P., Cherian, S. i Ferreira, R.B. (2004). Hydrogen peroxide mediated oxidative stress tolerance in *Lemna minor* L. Second EPSO Conference - interactions in Plant Biology, Cells, Plants and Communities. P118, Ischia, Italy.
- Hewitt, E.J. (1983). A perspective on mineral nutrition: essential and functional metals in plants. U: Robb, D.A., Pierpoint, W.S. (urednici), *Metals and micro-nutrients: uptake and utilization by plants.* Acad. Press, New York. 277-323.
- Hillman, W.S. (1961). The *Lemnaceae*, or duckweeds. *Bot. Rev.* 27, 221-287.
- Hillman, W.S. i Culley, D.D.Jr (1978). The uses of duckweed. *Am. Sci.* 66, 442-451.
- Huebert, D.B. i Shay, J.M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 481-483.
- IPCS (1992a). *Enviromental Health Criteria 134: Cadmium.* World Health Organization. Geneva.
- IPCS (1992b). *Enviromental Health Criteria 135: Cadmium - Enviromental Aspects.* World Health Organization. Geneva.
- ISO, (2001). Water quality - Determination of toxic effect of water constituents and waste water to duckweed (*Lemna minor*) - Duckweed growth inhibition test. U: International Organization for Standardization, International Standard ISO, 20079. 1-26.
- Kappus, H. (1985). Lipid peroxidation: mechanisms, analysis, enzymology and biochemical relevance. U: Sies, H. (urednik), *Oxidative Stress.* 273-310. Academic Press I, London.
- Kawano, T., Kawano, N., Muto, S. i Lapeyrie, F. (2001). Cation-induced superoxide generation in tobacco cell suspension culture is dependent on ion valence. *Plant Cell Environ.* 24, 1235-1241.
- Keller, T., Damude, H.G., Werner, D., Doerner, P., Doxon, R.A. i Lamb, C. (1998). A plant homolog of the neutrophyl NADPH oxidase gp91^{phox} subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *The Plant Cells* 10, 255-266.

- Kneer, R. i Zenk, M.H. (1992). Phytochelatins protect plant enzyme from heavy metal poisoning. *Phytochemistry* 31, 2663-2667.
- Knörzer, O.C., Durner, J. i Böger, P. (1996). Alternations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cell (*Glycine max*) induced by oxidative stress. *Plant Physiol.* 97, 388-396.
- Krajn i , B. i Devidé, Z. (1980). Report on photoperiodic responses in *Lemnaceae* from Slovenia. *Berichte des Geobot. Inst. ETH, Stiftung Rübel, Zürich*, 47, 75-86.
- K pper, H., K pper, F. i Spiller, M. (1996). Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *J. Exp. Bot.* 47, 259-266.
- Lewis, M.A. (1995). Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: A review. *Eviron. Pollut.* 87, 319-336.
- Lorimer, G.H. (1981). The carboxylation and oxygenation of ribulose-1,5-bisphosphate: The primary events in photosynthesis and photorespiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32, 349-383.
- Lorimer, G.H. i Mizioro, H.M. (1981). RuBP carboxylase: The mechanism of activation and its relation to catalysis. U: Akoyunoglou G. (urednik), *Regulation of Carbon Metabolism, Photosynthesis. IV*, 3-16. Balaban Int. Sci Serv. Philadelphia.
- McBride, M.B. (1989). Reactions controlling heavy metal solubilization in soils. *Adv. Soil Sci.* 10, 1-56.
- Mocquot, B., Vangronsveld, J., Clijsters, H. i Mench, M. (1996). Copper toxicity in young maize (*Zea mays* L.) plants: effects on growth, mineral and chlorophyll contents and enzyme activities. *Plant Soil* 182, 287-300.
- Mohan, B.S. i Hosetti, B.B. (1997). Potential phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* grown in sewage stabilization ponds. *Environ. Pollut.* 98, 233-238.
- Nakano, Y. i Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant Cell Physiol.* 22, 867-880
- Niesink, R.J.M., de Vries, J. i Hollinger, M.A. (1996). *Toxicology: Principles and Applications*, CRC Press, 28-29, 840-889. London.
- Pandolfini, T., Gabbriellini, R. i Comparini, C. (1992). Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. *Plant Cell Environ.* 15, 719-725.
- Pandolfini, T. i Gabbriellini, R. (1993). Changes in the activity and in the isoenzyme pattern of peroxidases from different cellular fraction in Ni-treated plants. U: Welinder, K.G.,

- Rasmussen, S.K., Penel C. i Greppin, H., (urednici), Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology, 417-421, University of Geneva. Ženeva, Švicarska.
- Peterson, P.J. i Alloway, B.J. (1979). Cadmium in soils and vegetation. U: Webb. M. (urednik), The Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium. 45-92. Elsevier, North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford 1974.
- Piqueras, A., Olmos, E., Martínez-Solano, J.R. i Hellín, E. (1999). Cd-induced oxidative burst in tobacco BY-2 cells: time-course, subcellular location and antioxidant response. Free Radical Research 31, S33-S38.
- Pirson, A. i Seidel, F. (1950). Zell- und stoffwechselphysiologische Untersuchungen an der Wurzel von *Lemna minor* unter besonderer Berücksichtigung von Kalium - und Calciummangel. Planta 38, 431-473.
- Pohlmeier, A. (1999). Metal speciation, chelation and complexing ligands in plants. U: Prasad, M.N.V. i Hagemeyer, J. (urednici), Heavy Metal Stress in Plants: From Molecule to Ecosystems. 29-50. Springer, Berlin, Germany.
- Poschenrieder, C., Gunsé, B. i Barceló, J. (1989). Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance, and abscisic acid content in expanding bean leaves. Plant Physiol. 90, 1365-1371.
- Powell, S.R (2000). The antioxidant properties of zinc. J. Nutr. 130, 1447-1454.
- Prasad, M.N.V. (1995a). Cadmium toxicity and tolerance to vascular plants. Environ. Exp. Bot. 35, 525-545.
- Prasad, K.V.S.K., Saradhi, P.P. i Sharmila P. (1999). Concerted action of antioxidant enzyme and curtailed growth and zinc toxicity in *Brassica juncea*. Env. Exp. Bot. 42, 1-10.
- Razinger, J., Dermastia, M., Koce, J.D. i Zrimec, A. (2008). Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) caused by short-term cadmium exposure. Environmental Pollution 153, 687-694.
- Ren, H-X., Wang, Z-L., Chen, X. i Zhu, Y-L. (1999). Antioxidative responses to different attitudes in *Plantago major*. Environ. Exp. Bot. 42, 51-59.
- Repka, V. i Fischerová, I. (1996). Distribution of stress-related anionic peroxidases in different cucumber organs. Biol. Plant. 38, 571-583.

- Rosas, I., Carbajal, M.E, Gomez-Arroyo, S., Belmont R. i Villalagos-Pietrini, R. (1984). Cytogenetic effects on cadmium accumulation on water hyacinth (*Eichornia crassipes*). Environ. Pollut. 33, 386-395.
- Sajwan, K.S. i Ornes, W.H. (1994). Phytoavailability and bioaccumulation of cadmium in duckweed plants (*Spirodela polyrrhiza* L. Schleid). J. Environ. Sci. Health. 29, 1035-1044.
- Salin, M.L. (1987). Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. Plant Physiol. 72, 681-689.
- Salt, D.E. i Rauser, W.E. (1995a). MgATP-dependent transport of phytochelatin across the tonoplast of oat roots. Plant Physiol. 107, 1293-1301.
- Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, N.P.B.A., Duchonkov, V., Ensley B.D., Chet, I. i Raskin, I. (1995b). Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. Biotechnology 13, 468-474.
- Salt, D.E., Prince, R.C., Pickering, I.J. i Raskin, I. (1995c). Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in *Indian mustard*. Plant Physiol. 109, 1427-1433.
- Sanità di Toppi, L. i Gabbrielli, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. Environ. Exp. Bot. 41, 105-130.
- Schreiber, L., Hartmann, K., Skrabbs, M. i Zeier, J. (1999). Apoplastic barrier in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. J. Exp Bot 50, 1267-1280.
- Shier, W.T. (1994). Metals as toxins in plants. J. Toxicol. – Toxin Rev. 13, 205-216.
- Siedlecka, A. (1995). Some aspects of interactions between heavy metals and plant mineral nutrients. Acta Soc. Bot. Pol. 3, 265-272.
- Somashekaraiah, B.V., Padmaja, K. i Prasada, A.R.K. (1992). Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. Plant Physiol. 85, 85-89.
- Street, J.J., Lindsay, W.L. i Sabey, B.R. (1977). Solubility and plant uptake of cadmium in soils amended with cadmium and sewage sludge. Environ. Qual. 6, 72-77.
- Stroi ski, A. (1999). Some physiological and biochemical aspects of plant resistance to cadmium effect I. Antioxidative system. Acta Plant Physiol. 21, 175-188.

- Taiz, L. i Zeiger, E. (1991). Stress Physiology U: Plant Physiology. Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., California.
- Tanaka, K., Otsubo T. i Kondo N. (1982). Participation of hydrogen peroxide in the inactivation of Calvin cycle SH enzymes in SO₂ - fumigated spinach leaves. Plant Cell Physiol. 23, 1009-1018.
- Taraldsen, J.E. i Noberg-King, T.J. (1990). New method for determining effluent toxicity using duckweed (*Lemna minor*). Environ. Toxicol. Chem. 9, 761-767.
- Tkalec, M., Perin i , Z., Vidakovi -Cifrek, Ž., Jelen i , B. i Regula I. (2003). Physiological response of duckweed (*Lemna minor* L.) to herbicide norflurazon. Period. Biol. 105, 269-274.
- Tkalec, M., Prebeg, T., Roje, V., Pevalek-Kozlina, B. i Ljubeši , N. (2008). Cadmium-induced responses in duckweed *Lemna minor* L. Acta Plant Physiol. 30, 881-890.
- Torres, M.A., Onouchi, H., Hamada, S., Machida, C., Hammond-Kosack, K.E. i Jones, J.D. (1998). Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91^{phox}). The Plant Journal 14, 365-370.
- Tyler, G., Balsberg-Pahlsson, A.M., Bengtsson, G., Baath, E., Tranvik, L. i Pahlsson, A.M.B. (1989). Heavy-metal ecology of terrestrial plants, microorganisms and invertebrates. A review. Water Air and Soil Pollut. 47, 189-215.
- Van Assche, F. i Clijsters, H. (1984). Interaction of zinc at the protein level with photosynthetic light and dark reactions in *Phaseolus vulgaris*, U: Sybesma C. (urednik), Advances in Photosynthesis Research 431-434. Part IV, Nijhoff/Junk Publisher, The Hague.
- Van Assche, F. i Clijsters, H. (1990). Commissioned review: Effects of metals on enzyme activity in plants. Plant Cell Environ. 13, 195-206.
- Van Assche, F. (1973). Physiological study of zinc toxicity on photosynthesis, Ph.D. Thesis, Univ. Instelling Antwerpen, Germany.
- Wang, W. (1986). The effect of river water on phytotoxicity of Ba, Cd and Cr. Environ. Pollut. 11, 193-204.
- Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environ. Res. 52, 7-22.
- Wang, W. (1991). Literature review on higher plants for toxicity testing. Water Air Soil Pollut. 59, 381-400.

- Welch R.M. (1995). Micronutrient nutrition of plants, Crit. Rev. Plant Sci. 14, 49-82.
- Weckx, J.E.J. i Clijsters, H.M.M. (1996). Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as a result of root assimilation of toxic amounts of copper. Plant Physiol. 96, 506-512.
- Wilson, D.N. (1988). Cadmium – marked trends and influences. U: 87th proceedings of the 6th International Cadmium Conference, 9-16. Cadmium Association, London.
- Zago, M.P. i Oteiza, P.I. (2001). The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants, Free Rad. Biol. Med. 31, 266-274.

Korištene Internet adrese:

www.agr.hr/cro/nastava/bs/moduli/doc/ag1114_mikro_elementi.pdf

<http://hr.wikipedia.org/wiki/Cink>

http://www.poliklinika-harni.hr teme/ekoteme/05teski_metali.asp

<http://www.plants.usda.gov/java/profile?symbol=LEMI3>

<http://www.belupo.hr/Default.aspx?sid=4763>

http://images.google.hr/imgres?imgurl=http://www.biolib.cz/IMG/GAL/4473.jpg&imgrefurl=http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id4473/&usg=__b-athobTE3cKPPOEkcPJa6-mI=&h=525&w=700&sz=88&hl=hr&start=6&um=1&tbnid=eSDu1ObmLg5eHM:&tbnh=105&tbnw=140&prev=/images%3Fq%3DLemna%2Bminor%2BL.%26hl%3Dhr%26lr%3Dlang_hr%26client%3Dfirefox-a%26channel%3Ds%26rls%3Dorg.mozilla:en-US:official%26sa%3DN%26um%3D1